



Université de Montréal

**Diversité fonctionnelle  
du facteur de transcription *Tbx5* dans le cœur**

Par

Romain Olivier Georges

Programme de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de *philosophiae doctor* (Ph.D.)  
en biologie moléculaire

Août 2011

© Romain Olivier Georges, 2011



Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

**Diversité fonctionnelle du facteur de transcription *Tbx5* dans le cœur**

Présentée par  
Romain Olivier Georges

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jacques Drouin, président-rapporteur  
Dr Mona Nemer, directeur de recherche  
Dr Jean-Philippe Gratton, membre du jury  
Dr Vincent Giguère, examinateur externe  
Dr Johanne Tremblay, représentante de la Doyenne

## Résumé

Le cœur des vertébrés est un organe modulaire qui requiert le " patterning " complexe des champs morphogénétiques cardiogènes et la convergence coordonnée des diverses sous-populations de progéniteurs cardiogéniques. Au moins 7 facteurs de transcription de la famille T-box coopèrent au sein de ces nombreuses sous-populations de progéniteurs cardiogéniques afin de réguler la morphogenèse et l'agencement de multiples structures le long de l'ébauche cardiaque, ce qui explique que les mutations humaines de ces gènes engendrent diverses malformations congénitales cardiaques (MCCs). L'un de ces gènes T-box, *Tbx5*, dont l'haploinsuffisance génère le syndrome de Holt-Oram (SHO), intervient dans une grande variété de réseaux de régulation géniques (RRGs) qui orchestrent la morphogenèse des oreillettes, du ventricule gauche, de la valve mitrale, des septums inter-auriculaire et inter-ventriculaire, ainsi que du système de conduction cardiaque. La diversité des RRGs impliqués dans la formation de ces structures cardiaques suggère que *Tbx5* détient une profusion de fonctions qui ne seront identifiables qu'en répertoriant ses activités moléculaires dans chaque lignée cardiaque examinée isolément. Afin d'aborder cette problématique, une ablation génétique de *Tbx5* dans l'endocarde a été réalisée. Cette expérience a démontré le rôle crucial de *Tbx5* dans la survie des cellules endocardiques bordant le septum primum et des cardiomyocytes au sein de cette structure embryonnaire qui contribuera à la morphogenèse du septum inter-auriculaire. En outre, cette étude a révélé l'existence d'une communication croisée entre la sous-population de cellules endocardiques *Tbx5*<sup>+</sup> et le myocarde au niveau du septum primum, afin d'assurer la survie des cardiomyocytes, et ultimement de garantir la maturation du septum inter-auriculaire. Nos résultats confirment aussi l'importance de l'interdépendance génétique (*Tbx5* et *Gata4* ainsi que *Tbx5* et *Nos3*) entre différents loci dans la morphogenèse de la cloison inter-auriculaire, et particulièrement de l'influence que peut avoir l'environnement sur la pénétrance et l'expressivité des communications inter-auriculaires (CIAs) dans le SHO. En outre, puisque les fonctions d'un gène dépendent ordinairement des différents isoformes qu'il peut générer, une deuxième étude a focalisé davantage sur l'aspect transcriptionnel de *Tbx5*. Cette approche a mené à la découverte de 6 transcrits

alternatifs exhibant des fonctions à la fois communes et divergentes. La caractérisation de 2 de ces isoformes a révélé le rôle de l'isoforme long (*Tbx5\_v1*) dans la régulation de la croissance des cardiomyocytes durant la cardiogénèse, tandis que l'isoforme court (*Tbx5\_v2*), préférentiellement exprimé dans le cœur mature, réprime la croissance cellulaire. Il est donc entièrement concevable que les mutations de *TBX5* entraînant une troncation de la région C-terminale accroissent la concentration d'une protéine mutée qui, à l'instar de *Tbx5\_v2*, interfère avec la croissance de certaines structures cardiaques. En revanche, la divergence de fonctions de ces isoformes, caractérisée par les disparités de localisation subcellulaire et de d'interaction avec d'autres cofacteurs cardiaques, suggère que les mutations affectant davantage un isoforme favoriseraient l'émergence d'un type particulier de MCC. Finalement, un dernier objectif était d'identifier le ou les mécanisme(s) moléculaire(s) par le(s)quel(s) *Tbx5* régule son principal gène cible, *Nppa*, et d'en extraire les indices qui éclairciraient sa fonction transcriptionnelle. Cet objectif nécessitait dans un premier lieu d'identifier les différents modules *cis*-régulateurs (MCRs) coordonnant la régulation transcriptionnelle de *Nppa* et *Nppb*, deux gènes natriurétiques dont l'organisation en tandem et le profil d'expression durant la cardiogénèse sont conservés dans la majorité des vertébrés. L'approche d'empreinte phylogénétique employée pour scanner le locus *Nppb/Nppa* a permis d'identifier trois MCRs conservés entre diverses espèces de mammifères, dont un (US3) est spécifique aux euthériens. Cette étude a corroboré que la régulation de l'expression du tandem génique *Nppb/Nppa* requérait l'activité transcriptionnelle d'enhancers en complément aux promoteurs de *Nppa* et *Nppb*. La concordance quasiment parfaite entre les profils d'expression de *Tbx5* et de ces deux gènes natriurétiques chez les mammifères, suggère que le gradient d'expression ventriculaire de *Tbx5* est interprété par le recrutement de ce facteur au niveau des différents enhancers identifiés. En somme, les études présentées dans cette thèse ont permis de clarifier la profusion de fonctions cardiaques que possède *Tbx5*. Certaines de ces fonctions émanent de l'épissage alternatif de *Tbx5*, qui favorise la synthèse d'isoformes dotés de propriétés spécifiques. Les diverses interactions combinatoires entre ces isoformes et d'autres facteurs cardiaques au sein des diverses sous-populations de

progéniteurs cardiogènes contribuent à l'émergence de RRGs cardiaques divergents.

**Mots clés:** *Tbx5*, *Nppa*, *Nppb*, *Nos3*, *Gata4*, endocarde, cardiogénèse, communication inter-auriculaire, malformation congénitale cardiaque, syndrome de Holt-Oram, enhancer, épissage alternatif.

## Abstract

The vertebrate heart is a modular organ, which requires the complex patterning of the morphogenetic heart fields and the coordinated convergence of the diverse subpopulations of cardiogenic progenitors. At least 7 transcription factors of the T-box family cooperate within these numerous subpopulations of cardiogenic progenitors to regulate the morphogenesis and the layout of multiple structures along the primordial heart tube, which explains that the human mutations of these genes induce various congenital heart defects (CHDs). One of these T-box genes, *Tbx5*, whose haploinsufficiency generates the Holt-Oram syndrome (HOS), intervenes in a wide variety of gene regulatory networks (GRNs) that orchestrate the morphogenesis of the atria, the left ventricle, the mitral valve, the inter-atrial and inter-ventricular septa, as well as the cardiac conduction system. The diversity of GRNs involved in the formation of these cardiac structures suggests that *Tbx5* holds a profusion of functions which will be identifiable only by indexing its molecular activities in each separately examined cardiac lineage. To address this problem, a conditional knockout of *Tbx5* in the endocardium was generated. This experiment demonstrated a crucial role of *Tbx5* in the survival of the endocardial cells lining the septum primum and the cardiomyocytes within this embryonic structure, which will contribute to the morphogenesis of the inter-atrial septum. Moreover, this study revealed a crosstalk between the *Tbx5*-positive endocardial cells subpopulation and the myocardium at the level of the septum primum to ensure the survival of cardiomyocytes, and ultimately to guarantee the maturation of the inter-atrial septum. Our results also confirmed the importance of genetic interdependence (*Tbx5* and *Gata4* as well as *Tbx5* and *Nos3*) between different loci in the morphogenesis of the inter-atrial septum, and particularly the influence that the environment can have on the penetrance and the expressivity of atrial septal defects (ASDs) in the HOS. Besides, since the functions of a gene usually depend on the different isoforms it can generate, a second study focused more on the transcriptional aspect of *Tbx5*. This approach led to the discovery of 6 alternative transcripts exhibiting both common and specific functions. The characterization of 2 of these isoforms revealed the role of the long isoform (*Tbx5\_v1*) in the regulation of cardiomyocytes growth during cardiogenesis,

whereas the short isoform (*Tbx5\_v2*), preferentially expressed in the mature heart, represses cell growth. It is thus entirely conceivable that *TBX5* mutations leading to a C-terminal truncation increase the concentration of a mutated protein, which, like *Tbx5\_v2*, interferes with the growth of certain cardiac structures. On the other hand, the divergence of functions of these isoforms, characterized by the disparities of subcellular localization and interaction with other cardiac cofactors, suggests that mutations affecting more one isoform would favor the emergence of a particular type of CHD. Finally, a last objective was to identify one or several molecular mechanism(s) by which *Tbx5* regulates its main target gene, *Nppa*, and to extract clues that might clarify its transcriptional function. This objective required in a first place to identify the various *cis*-regulatory modules (CRMs) coordinating the transcriptional regulation of *Nppa* and *Nppb*, two natriuretic genes whose tandem organization and expression pattern during cardiogenesis are preserved in most vertebrates. The phylogenetic footprint approach employed to scan the *Nppb/Nppa* locus allowed the identification of three CRMs evolutionary conserved between different mammals species, one of which (US3) is specific to eutherians. This study confirmed that the regulation of the tandem genes *Nppb/Nppa* required the transcriptional activity of enhancers in complement to *Nppa* and *Nppb* promoters. The almost perfect concordance between the expression profiles of *Tbx5* and these two natriuretic genes in mammals, suggests that the ventricular expression gradient of *Tbx5* is interpreted by the recruitment of this factor to the identified enhancers. Altogether, the studies presented in this thesis allowed clarifying the profusion of *Tbx5* cardiac functions. Some of these functions emanate from the alternative splicing of *Tbx5*, which favors the synthesis of isoforms endowed with specific properties. The diverse combinatorial interactions between these isoforms and other cardiac factors within the various cardiogenic progenitor subpopulations contribute to the emergence of distinct cardiac RRGs.

**Key words:** *Tbx5*, *Nppa*, *Nppb*, *Nos3*, *Gata4*, endocardium, cardiogenesis, atrial septal defect, congenital heart defect, Holt-Oram syndrome, enhancer, alternative splicing.

# Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	vi
Table des matières .....	viii
Liste des figures.....	xiii
Liste des abréviations .....	xv
Remerciements.....	xxiii
Chapitre 1. Introduction.....	1
1.1 Cardiogénèse .....	1
1.1.1 Formation du mésoderme cardiaque et du croissant cardiaque .....	1
1.1.1.1 Induction et répression cardiogénique précoce : établissement du champ morphogénétique cardiaque.....	5
1.1.1.1.1 Induction cardiogénique précoce : rôles des BMPs dans la spécification cardiogénique .....	5
1.1.1.1.2 Induction cardiogénique précoce : rôles des FGFs dans la prolifération / migration des précurseurs cardiaques et dans la spécification cardiogénique.....	6
1.1.1.1.3 Induction et répression cardiogénique précoce : rôle biphasique stade-spécifique des voies Wnt .....	7
1.1.1.1.4 Induction cardiogénique précoce : rôle de la voie Notch .....	8
1.1.1.1.5 Induction cardiogénique précoce : rôle de VEGF .....	9
1.1.2 Formation du tube cardiaque linéaire primaire.....	10
1.1.3 Inflexion sigmoïde cardiaque ou boucle cardiaque (" Looping ") .....	10
1.1.3.1 Croissance du tube et de la boucle cardiaque .....	11
1.1.3.2 Morphogénèse durant la formation du tube cardiaque linéaire et de l'inflexion sigmoïde.....	12
1.1.3.2.1 " Patterning " antéro-postérieur du tube cardiaque.....	14
1.1.3.2.2 " Patterning " dorso-ventral du tube cardiaque .....	17
1.1.3.2.3 Latéralité gauche/droite du tube cardiaque .....	18
1.1.4 Septation (cloisonnement) et maturation des chambres cardiaques ...	20
1.1.4.1 Septation (cloisonnement) auriculaire.....	20
1.1.4.2 Septation (cloisonnement) ventriculaire .....	24

1.1.4.3 Septation (cloisonnement) du canal auriculo-ventriculaire.....	24
1.1.4.4 Septation (cloisonnement proximale et bipartition distale) du tronc artériel .....	25
1.1.5 Origine et diversité des populations de progéniteurs cardiogènes.....	27
1.1.5.1 Progéniteurs du mésoderme cardiogène .....	30
1.1.5.1.1 Progéniteurs du champ cardiaque primaire (CCP) .....	30
1.1.5.1.2 Progéniteurs du champ cardiaque secondaire (CCS) / Progéniteurs du champ cardiaque antérieur .....	31
1.1.5.2 Progéniteurs pro-épicaux .....	35
1.1.5.3 Cellules cardiogènes de la crête neurale .....	37
1.1.6 Signalisation endothélio-myocardique.....	39
1.1.6.1 Endocarde.....	39
1.1.6.2 Myocarde .....	42
1.1.6.3 Interaction moléculaire endocarde-myocarde .....	44
1.1.6.3.1 Interaction endocarde-myocarde durant la cardiogénèse .....	44
1.1.6.3.1.1 Développement des bourrelets endocardiques .....	45
1.1.6.3.1.2 Trabéculisation des compartiments ventriculaires .....	47
1.1.6.3.1.3 Formation du myocarde compact (compaction myocardique) .....	49
1.1.6.3.2 Interaction endocarde-myocarde dans le cœur adulte .....	50
1.2 Régionalisation cardiaque des programmes transcriptionnels .....	51
1.2.1 Facteurs de transcription impliqués dans la cardiogénèse .....	52
1.2.1.1 Famille des facteurs GATA .....	52
1.2.1.2 Famille des facteurs à homéodomaine : sous-famille NK-2.....	55
1.2.1.3 Famille des facteurs à boîte T.....	56
1.2.1.3.1 T-box 1 ( <i>Tbx1</i> ) .....	57
1.2.1.3.2 T-box 2 ( <i>Tbx2</i> ) .....	59
1.2.1.3.3 T-box 3 ( <i>Tbx3</i> ) .....	61
1.2.1.3.4 T-box 18 ( <i>Tbx18</i> ) .....	63
1.2.1.3.5 T-box 20 ( <i>Tbx20</i> ) .....	65
1.2.1.3.6 T-box 5 ( <i>Tbx5</i> ) .....	66
1.3 Malformations congénitales cardiaques et pathologies cardiaques .....	72
1.3.1 Malformations congénitales cardiaques (MCCs).....	73



1.3.1.1 Cardiopathies congénitales isolées acyanogènes sans shunt.....	77
1.3.1.2 Cardiopathies congénitales isolées acyanogènes avec shunt gauche-droit .....	78
1.3.1.3 Cardiopathies congénitales isolées cyanogènes avec augmentation de la circulation pulmonaire.....	80
1.3.1.4 Cardiopathies congénitales isolées cyanogènes avec diminution de la circulation pulmonaire .....	80
1.3.1.5 Cardiopathies congénitales complexes et syndromes cardiaques.....	81
1.4 Homéostasie cardiovasculaire et hypertrophie cardiaque.....	82
1.4.1 Hypertrophie physiologique du cœur .....	83
1.4.2 Hypertrophie pathologique du cœur.....	83
1.4.3 Fonctions des facteurs natriurétiques <i>Nppa</i> et <i>Nppb</i> dans l'homéostasie cardiovasculaire .....	86
1.4.4 Fonctions de l'oxyde nitrique (NO) dans l'homéostasie cardiovasculaire .....	90
1.5 Objectif de travail .....	94
Chapitre 2. Distinct expression and function of alternatively spliced Tbx5 isoforms in cell growth and differentiation. ( <i>Publié</i> ). ....	96
2.1 Contributions .....	97
2.2 Abstract .....	98
2.3 Introduction.....	99
2.4 Material and methods .....	102
2.5 Results.....	105
2.6 Discussion .....	113
2.7 Acknowledgements .....	118
2.8 Sources of funding.....	119
2.9 References .....	120
2.10 Figure legends.....	125
Chapitre 3. An endocardial pathway involving Tbx5, Gata4 and Nos3 required for atrial septum formation. ( <i>Publié</i> ). ....	139
3.1 Contributions .....	140
3.2 Abstract .....	141

3.3 Introduction .....	142
3.4 Results.....	144
3.5 Discussion .....	150
3.6 Materials and methods .....	154
3.7 Acknowledgements .....	155
3.8 Reference list.....	156
3.9 Supplementary materials and methods .....	163
3.10 Figure legends.....	166
Chapitre 4. Phylogenetic footprinting identifies novel chamber-specific cardiac enhancers within the <i>Nppb/Nppa</i> locus. ( <i>Soumis</i> ).....	177
4.1 Contributions .....	178
4.2 Abstract .....	179
4.3 Introduction.....	180
4.4 Results.....	183
4.5 Discussion .....	190
4.6 Materials and methods .....	195
4.7 Acknowledgements .....	198
4.8 Sources of funding.....	199
4.9 Reference List .....	200
4.10 Supplementary Data S1 .....	206
4.11 Figure legends.....	224
Chapitre 5. Résultats supplémentaires .....	235
Chapitre 6. Discussion .....	237
6.1 Fonctions de <i>Tbx5</i> dans la genèse des septums cardiaques.....	238
6.1.1 Fonctions endocardiques et myocardiques de <i>Tbx5</i> dans la genèse du septum inter-auriculaire .....	238
6.1.2 Fonctions myocardiques de <i>Tbx5</i> dans la genèse du septum inter-ventriculaire.....	246
6.2 Affinage des fonctions cardiaques de <i>Tbx5</i> via l'action subsidiaire d'isoformes alternatifs.....	249
6.3 <i>Tbx5</i> dans la régionalisation transcriptionnelle du tandem génique <i>Nppb/Nppa</i> .....	257
6.4 Conclusions et perspectives.....	268

Bibliographie .....	272
---------------------	-----

## Liste des figures

Fig. 1.1. Contribution cardiaque des champs cardiogènes primaire (CCP) et secondaire (CCS). .....	3
Fig. 1.2. Champs cardiogènes primaire (CCP) et secondaire (CCS) durant la cardiogénèse. ....	4
Fig. 1.3. Développement du septum inter-auriculaire durant la cardiogénèse. ....	22
Figure 2.1. Schematic representation of the <i>Tbx5</i> isoforms and their distribution during embryonic heart development. ....	129
Figure 2.2. Characterization of the anti-TBX5 antibody. ....	130
Figure 2.3. Endogenous TBX5 expression in cardiac cells. ....	131
Figure 2.4. Structure-function analysis of TBX5. ....	132
Figure 2.5. Differential ability of the two <i>Tbx5</i> isoforms to bind DNA and activate transcription. ....	133
Figure 2.6. Mapping the physical and functional interaction domains of GATA-4 and TBX5. ....	134
Figure 2.7. Elution profile of endogenous TBX5, NKX2.5 and GATA-4. ....	135
Figure 2.8. Immunohistochemical analysis of heart sections from adult transgenic mice ectopically expressing (right panels) or not (left panels) TBX5a. ....	136
Figure 2.9. Reexpression of <i>Tbx5a</i> in adult hearts leads to cardiomyocyte hypertrophy. ....	137
Figure 2.10. Differential effects of transient transfection of <i>Tbx5</i> isoforms in C2C12 myoblasts. ....	138
Figure 3.1. <i>Tbx5</i> expression in endocardial cells. ....	170
Figure 3.2. Histologic analysis of secundum-type ASDs in <i>eTbx5<sup>+/-</sup></i> , <i>eTbx5<sup>-/-</sup></i> and CMV-Cre; <i>Tbx5<sup>wt/flox</sup></i> mice. ....	171
Figure 3.3. Genetic interaction between <i>Tbx5</i> and <i>Gata4</i> and <i>Nos3</i> . ....	172
Figure 3.4. Excessive apoptosis of the septum primum in <i>eTbx5<sup>-/-</sup></i> mice. ....	173
Figure 3.S1. TBX5 expression in endocardial cells in late embryonic stages. ....	174
Figure 3.S2. ECG recording on aged (460 d) mice. ....	175
Figure 3.S3. Excessive apoptosis of the septum primum in <i>eTbx5<sup>-/-</sup></i> mice. ....	176

Figure 4.1. Localization by phylogenetic footprinting of four potentially functional ECRs upstream of the <i>Nppb/Nppa</i> locus across three mammal species.....	228
Figure 4.2. Basal and stimulated states of the four mouse ECRs in different cell types. ....	229
Figure 4.3. Cardiac transcription factor recruitment to the <i>Nppb/Nppa</i> promoters and the CRMs in ventricular cardiomyocytes. ....	230
Figure 4.4. TBX5 binding to the <i>Nppa</i> promoter and US2 module TBE sites.....	231
Figure 4.5. SRF occupancy of the <i>Nppa</i> promoter and US2 module SRE sites..	232
Figure 4.6. Frequencies of transient transgenic embryos at E12.5. ....	233
Figure 4.7. US modules enhancer activity in transient transgenic embryos at E12.5.....	234
Figure 5.1. Représentation des isoformes alternatifs de <i>Tbx5</i> chez <i>Mus musculus</i> .....	235

## Liste des abréviations

- **5HT** : 5-Hydroxytryptamine (aussi nommé " sérotonine ")
- **5HT<sub>2B</sub>** : " *5-Hydroxytryptamine receptor 2B* " ou " *Serotonin receptor 2B* " (aussi nommé " HTR2B " : " *5-Hydroxytryptamine receptor 2B* ")
  
- **ADN** : Acide Désoxyribonucléique (en anglais, " DNA " : " *Desoxyribonucleic Acid* ")
- **ADNc** : Acide Désoxyribonucléique complémentaire (en anglais, " cDNA " : " *complementary DNA* ")
- **ANF** : " *Atrial Natriuretic Factor* "
- **ANP** : " *Atrial Natriuretic Peptide* "
- **AP** : Antéro-Postérieur
- **AR** : Acide Rétinoïque
- **ARN** : Acide Ribonucléique (en anglais, " RNA " : " *Ribonucleic Acid* ")
- **ARNi** : ARN interférence ou ARN interférent (en anglais, " RNAi " : " *Ribonucleic Acid-interference* ")
- **ASD** : " *Atrial Septum Defect* " (en français, " CIA " : " Communication Inter-Auriculaire ")
  
- **BAFs** : " *Brg1/Brm-associated factors* "
- **BMP** : " *Bone Morphogenetic Protein* "
- **BNP** : " *Brain Natriuretic Peptide* "
  
- **Canal AV** : Canal Auriculo-Ventriculaire
- **CCP** : Champ Cardiaque Primaire
- **CCS** : Champ Cardiaque Secondaire
- **cGMP** : " *Cyclic Guanosine Monophosphate* " (en français, " GMPc " : " Guanosine Monophosphate cyclique ")
- **CHD** : " *Congenital Heart Defect* " ou " *Congenital Heart Disease* " (en français, " MCC " : " Malformation Congénitale Cardiaque " ou " Maladie Congénitale Cardiaque ")

- **CIA** : Communication Inter-Auriculaire (en anglais, " ASD " : " *Atrial Septum Defect* ")
- **CIV** : Communication Inter-Ventriculaire (en anglais, " VSD " : " *Ventricular Septum Defect* ")
- **CNCC** : " *Cardiac Neural Crest Cell* " (en français, " cellule cardiogène dérivée de la crête neurale ")
- **Cre** : Cre recombinase
- **CRM** : " *Cis-Regulatory Module* " (en français, " MCR " : " Module *Cis*-Regulateur ")
  
- **DGS** : " *DiGeorge Syndrome* " (OMIM 188400) (en français, " SDG " : " Syndrome de DiGeorge ")
- **Dkk1** : " *Dickkopf-related protein 1* "
- **Dll1** : " *Delta-like 1* " acts as a ligand for *Notch* receptors
- **DORV** : " *Double Outlet Right Ventricle* " (en français, " ventricule droit à double sortie " ou " ventricule droit à double issue ")
- **DV** : Dorso-Ventral
  
- **Ednra** : " *Endothelin receptor type A* "
- **EMSA** : " *Electrophoretic Mobility Shift Assay* "
- **EMT** : " *Epithelial-Mesenchymal Transition* " (en français, " TEM " : " Transition Épithélio-Mésenchymateuse ")
- **ErbB1** : " *Receptor tyrosin-protein kinase ErbB-1* " (aussi nommé " EGFR " : " *Epidermal Growth Factor Receptor* ")
- **ErbB2** : " *Receptor tyrosin-protein kinase ErbB-2* " (aussi nommé " neu " chez les rongeurs et " HER2 " chez les humains : " *Human Epidermal growth factor Receptor 2* ")
- **ErbB3** : " *Receptor tyrosin-protein kinase ErbB-3* " (aussi nommé " HER3 " : " *Human Epidermal growth factor Receptor 3* ")
- **ErbB4** : " *Receptor tyrosin-protein kinase ErbB-4* " (aussi nommé " HER4 " : " *Human Epidermal growth factor Receptor 4* ")
  
- **Fgf** : " *Fibroblast Growth Factor* "

- **Fgfr** : " *Fibroblast Growth Factor Receptor* "
- **Flk1** : " *Fetal Liver Kinase 1* " (aussi nommé " VEGFR2 " : " *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2* ", " KDR " : " *Kinase insert Domain Receptor (a type III receptor tyrosine kinase)* ")
- **Flt1** : " *Fms-Like Tyrosine kinase 1* " ou " *Fms-related Tyrosine kinase 1* " (aussi nommé " VEGFR1 " : " *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1* ")
- **Flt4** : " *Fms-Like Tyrosine kinase 4* " ou " *Fms-related Tyrosine kinase 4* " (aussi nommé " VEGFR3 " : " *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3* ")
- **FOG2** : " *Friend of GATA2* " (aussi nommé " ZFPM2 " : " *Zinc Finger Protein, Multitype 2* ")
- **FOP** : Foramen Ovale perméable Persistant (en anglais, " PFO " : " *Patent Foramen Ovale* ")
  
- **GMPc** : Guanosine Monophosphate cyclique (en anglais, " cGMP " : " *Cyclic Guanosine Monophosphate* ")
- **GRN** : " *Gene Regulatory Network* " (en français, " RRG " : " Réseau de Régulation Génique ")
- **GTP** : Guanosine Triphosphate (en anglais, " *Guanosine Triphosphate* ")
  
- **Hand** : " *Heart- and neural crest derivatives-expressed protein* "
- **HER2/neu** (ou " ErbB2 ") : " *Human Epidermal growth factor Receptor 2* "
- **HER3** (ou " ErbB3 ") : " *Human Epidermal growth factor Receptor 3* "
- **HER4** (ou " ErbB4 ") : " *Human Epidermal growth factor Receptor 4* "
- **Hey1** : " *Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1* " (aussi nommé " Chf2 ", " Herp2 ", " Hesr1 ", " Hrt1 ", " Oaf1 ")
- **Hey2** : " *Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 2* " (aussi nommé " Chf1 ", " Gridlock ", " Grl ", " Herp1 ", " Hesr2 ", " Hrt2 ")
- **Hey3** : " *Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 3* " (aussi nommé " Hesr3 ", " HeyL ", " Hrt3 ")
- **HH** : Hamburger Hamilton
- **HOS** : " *Holt-Oram Syndrome* " (OMIM 142900) (en français, " SHO " : " Synrome d'Holt-Oram ")



- **IGF** : " *Insulin-like Growth Factor* "
- **Isl-1** (ou " **Isl1** ") : Islet-1 (" *Isl LIM homeobox 1* ")
- **IVS** : " *Interventricular Septum* " (en français, " septum inter-ventriculaire ")
  
- **KDR** : " *Kinase insert Domain Receptor (a type III receptor tyrosine kinase)* " (aussi nommé " **VEGFR2** " : " *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2* ", " **Flk1** " : " *Fetal Liver Kinase 1* ")
  
- **LCR** : " *Locus Control Region* " (en français, " Région de contrôle du locus ")
- **LIM** : " *Lin-11, Isl-1, and Mec-3 conserved domain* "
- **LMP4** : " *LIM mineralization protein 4* " est un des isoformes obtenu par épissage alternatif de l'ARN pré-messager de *Pdlim7*
  
- **MCC** : Malformation Congénitale Cardiaque ou Maladie Congénitale Cardiaque (en anglais, " **CHD** " : " *Congenital Heart Defect* " ou " *Congenital Heart Disease* ")
- **MCR** : Module *Cis*-Régulateur (en anglais, " **CRM** " : " *Cis-Regulatory Module* ")
- **MEF2** : " *Myocyte Enhancer Factor-2* "
- **Mesp1** : " *Mesoderm Posterior protein 1* "
- **Mesp2** : " *Mesoderm Posterior protein 2* "
- **Mlc2a** : " *Myosin Light Chain 2a* " (aussi nommé " **Myl7** " : " *Myosin, Light chain 7, regulatory* ", " *Myosin, Light polypeptide 7, regulatory* ", ou " *Myosin regulatory light chain 2, atrial isoform* ")
- **Myl7** : " *Myosin, Light chain 7, regulatory* ", " *Myosin, Light polypeptide 7, regulatory* ", ou " *Myosin regulatory light chain 2, atrial isoform* " (aussi nommé " **Mlc2a** " : " *Myosin Light Chain 2a* ")
  
- **NICD** : " *Notch Intracellular Domain* " (en français, " Domaine intracellulaire de *Notch* ")
- **Nkx2.5** : " *NK2 homeobox 5* "
- **nlaacZ** : Gène bactérien *lacZ* modifié possédant un signal de localisation nucléaire et une duplication intragénique de 1.1 kb introduisant un codon STOP (TGA), et qui fut sélectionnée en fonction de la fréquence de recombinaison

estimée et du nombre de cellules myocardiques [1]. Ce gène *nlaacZ* est inactif jusqu'à un évènement rare de recombinaison intragénique qui génère un clone avec une séquence fonctionnelle *nlacZ* capable de synthétiser la  $\beta$ -galactosidase.

- **nlacZ** : Gène bactérien *lacZ*
- **NO** : Oxyde Nitrique (ou " monoxyde d'azote ") (en anglais, " NO " : " *Nitric Oxyde* ")
- **NO-GC (sGC)** : " *NO-sensitive guanylyl cyclase* " ou " *soluble Guanylyl cyclase* " (en français, " GCs " : " Guanylates Cyclases solubles " sensibles à l'oxyde nitrique ou " récepteurs cytosoliques de l'oxyde nitrique ")
- **NOS** : NO Synthétase (en anglais, " NOS " : " *Nitric Oxyde Synthase* ")
- **NOS1** : NOS neuronale (aussi nommé " nNOS ")
- **NOS2** : NOS inductible (aussi nommé " iNOS ")
- **NOS3** : NOS endothéliale (aussi nommé " eNOS ")
- **Nppa** : " *Natriuretic Peptide Precursor A* " (aussi nommé " *Atriopeptin* ", " *Natriuretic Peptide A* ", " ANF " : " *Atrial Natriuretic Factor* ", " ANP " : " *Atrial Natriuretic Peptide* ")
- **Nppb** : " *Natriuretic Peptide Precursor B* " (aussi nommé " *Natriuretic Peptide B* ", " BNP " : " *Brain Natriuretic Peptide* ")
- **Nppc** : " *Natriuretic Peptide Precursor C* " (aussi nommé " *Natriuretic Peptide C* ", " CNP " : " *C-type Natriuretic Peptide* ")
- **NPR-A** (ou " **GC-A** ") : Récepteur de type A des peptides natriurétiques ou " GC-A " : Guanylate Cyclase de type A (en anglais, " NPR-A " : " *Natriuretic Peptide Receptor A* " ou " GC-A " : " *Guanylate Cyclase A* " ou " *Guanylyl Cyclase A* " ou " *Guanyl Cyclase A* ")
- **NPR-B** (ou " **GC-B** ") : Récepteur de type B des peptides natriurétiques ou " GC-B " : Guanylate Cyclase de type B (en anglais, " NPR-B " : " *Natriuretic Peptide Receptor B* " ou " GC-B " : " *Guanylate Cyclase B* " ou " *Guanylyl Cyclase B* " ou " *Guanyl Cyclase B* ")
- **NPR-C** (ou " **GC-C** ") : Récepteur de type C des peptides natriurétiques ou " GC-C " : Guanylate Cyclase de type C (en anglais, " NPR-C " : " *Natriuretic Peptide Receptor C* " ou " GC-C " : " *Guanylate Cyclase C* " ou " *Guanylyl Cyclase C* " ou " *Guanyl Cyclase C* ")

- **Nrg1**: Neuréguline 1
  
- **P300** : " *E1A-binding protein, 300 kD* " (aussi nommé " *Histone acetyltransferase p300* ", " p300 HAT ", " KAT3B ", " RSTS2 ", " EP300 " : " *E1A binding protein p300* ", " EP300 " : " *E1A-associated protein p300* ")
- **PDA** : " *Patent Ductus Arteriosus* " (en français, " persistance du canal artériel ")
- **Pdlim7** : PDZ and LIM domain 7 (enigma) (aussi nommé " LMP " : " LIM mineralization protein "); LMP4 est un des isoformes obtenu par épissage alternatif de l'ARN pré-messager de *Pdlim7*
- **PEO** : " *Pro-Epicardial Organ* " (en français, " PEO " : " Organe Pro-épicardique " ou " Séreuse Pro-épicardique ")
- **PFO** : " *Patent Foramen Ovale* " (en français, " FOP " : " Foramen Ovale perméable Persistant ")
- **Pitx** : " *Pituitary homeobox* "
- **PTA** : " *Persistent Truncus Arteriosus* " (aussi nommé " *truncus arteriosus* " ou " *common arterial trunk* ") (en français, " TAC " : " Tronc Artériel Commun ")
  
- **Raldh2** : Rétinaldéhyde Déhydrogénase de type 2
- **ROSA26** : réfère au locus où une copie unique d'un retrovirus Gen-ROSA $\beta$ geo a été insérée ( $\beta$ geo code pour les gènes de la *néomycine* et de *lacZ*). ROSA26 (ROSA $\beta$ geo26) correspond donc à la lignée de souris dérivée d'une des cellules ES infectées par ce rétrovirus.
- **RRG** : Réseau de Régulation Génique (en anglais, " GRN " : " *Gene Regulatory Network* ")
- **RYR** : " *Ryanodine Receptor* "
  
- **SDG** : Syndrome de DiGeorge (en anglais, " DGS " : " *DiGeorge Syndrome* " (OMIM 188400))
- **SERCA2** : " *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase 2* " (aussi nommé " ATP2B ", " ATP2A2 " : " *ATPase, Ca<sup>2+</sup> transporting, cardiac muscle, slow twitch 2* ")

- **SHO** : Syndrome d'Holt-Oram (en anglais, " HOS " : " *Holt-Oram Syndrome* " (OMIM 142900))
- **SRF** : " *Serum Response Factor* "
- **SVCF** : Syndrome VéloCardioFacial (en anglais, " VCFS " : " *Velo-Cardio-Facial Syndrome* " (OMIM 192430))
  
- **TAC** : Tronc Artériel Commun (en anglais, " PTA " : " *Persistent Truncus Arteriosus* ", " *truncus arteriosus* ", ou " *common arterial trunk* ")
- **TBE** : " *T-box Binding Element* "
- **Tbx** : T-box
- **TEM** : Transition Épithélio-Mésenchymateuse (en anglais, " EMT " : " *Epithelial-Mesenchymal Transition* ")
- **TGA** : " *Transposition of Great Arteries* " (en français, " TGV " : " Transposition des Gros Vaisseaux ")
- **TGFR** (ou " **TBR** ") : " *Transforming Growth Factor Receptor* "
- **TGF $\beta$**  : " *Transforming Growth Factor  $\beta$*  "
- **TGV** : Transposition des Gros Vaisseaux (en anglais, " TGA " : " *Transposition of Great Arteries* ")
- **TIE** : " *Tyrosine kinase with Immunoglobulin-like loops and Epidermal growth factor homology domains* "
- **TOF** : Tétralogie de Fallot (en anglais, " TOF " : " *Tetralogy of Fallot* ")
  
- **US1** : " *Upstream Sequence 1* "
- **US2** : " *Upstream Sequence 2* "
- **US3** : " *Upstream Sequence 3* "
- **US4** : " *Upstream Sequence 4* "
  
- **VCFS** : " *Velo-Cardio-Facial Syndrome* " (OMIM 192430) (en français, " SVCF " : " Syndrome VéloCardioFacial ")
- **VEGF** : " *Vascular Endothelial Growth Factor* "
- **VEGFR1** : " *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1* " (aussi nommé " Flt1 " : " *Fms-Like Tyrosine kinase 1* " ou " *Fms-related Tyrosine kinase 1* ")

- **VEGFR2** : " *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2* " (aussi nommé " Flk1 " : " *Fetal Liver Kinase 1* ", " KDR " : " *Kinase insert Domain Receptor (a type III receptor tyrosine kinase)* ")
- **VEGFR3** : " *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3* " (aussi nommé " Flt4 " : " *Fms-Like Tyrosine kinase 4* " ou " *Fms-related Tyrosine kinase 4* ")
- **VSD** : " *Ventricular Septum Defect* " (en français, " CIV " : " *Communication Inter-Ventriculaire* ")
- **Wnt** : " *Wingless-type MMTV integration site family* "

## Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier Mona NEMER, ma directrice de thèse, pour m'avoir accueilli chaleureusement au sein de son équipe et permis d'explorer des sujets de recherche captivants tout au long de mon doctorat. Je garderais un souvenir impérissable de son dynamisme, de sa détermination, et de nos discussions passionnées sur de nombreux sujets.

Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude aux membres de mon jury (Jacques DROUIN, Jean-Philippe GRATTON, et Vincent GIGUÈRE) pour avoir sans hésitation accepté de juger mon travail.

Un grand merci aux anciens membres de laboratoire qui ont composé l'équipe de Mona Nemer, pour leur enthousiasme et leur amabilité. Merci également pour les innombrables discussions et la musique assourdissante de vos musiciens québécois favoris.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance aux multiples amis et collègues (Audrey, Bruno, Sophie, Jean-François, Aurore, Loulwa, Abir, Hiba, Wael, Marisol, Olivier, Mathieu, Dérek, Mario, George, Damien, Steve, Konstantin, Julien, Aurélio, Lionel, Martin, Brigitte et tous les autres) qui ont hanté le salon étudiant et les coins café de l'IRCM. Un immense merci pour tous les bons moments partagés avec vous. Merci aussi pour votre soutien indéfectible.

Je remercie aussi infiniment Nathalie Bouchard et Chantal Lefebvre qui m'ont aidé dans de nombreuses manips. Merci Nathalie pour ta vivacité, c'était un véritable plaisir de travailler avec toi.

Merci à Lise Laroche pour son assistance sensationnelle et sa gentillesse inaltérable.

Finalement, une gratitude indéfectible et emplie d'émotions pour ma famille qui a été d'un incroyable soutien et réconfort malgré le vaste océan atlantique qui nous a séparés toutes ces années.

# Chapitre 1. Introduction

## 1.1 Cardiogénèse

Chez les vertébrés, le cœur est un organe musculaire qui fait office de pompe et dont les contractions rythmiques assurent la circulation sanguine unidirectionnelle permanente dans l'ensemble des organes via les vaisseaux sanguins. Cet organe détient également une fonction endocrine indispensable au maintien de l'homéostasie cardiovasculaire puisque les hormones cardiaques qu'il synthétise sont impliquées dans la régulation de la pression et du volume sanguin, ainsi que dans l'équilibre en électrolytes. En revanche, le rôle vital du cœur durant l'embryogenèse, d'une part dans la distribution des nutriments et de l'oxygène, et d'autre part dans l'élimination des déchets métaboliques et du dioxyde de carbone, explique que ce soit le premier organe fonctionnel à se former chez l'embryon. Son développement nécessite une série d'événements moléculaires et morphogénétiques précisément orchestrés spatio-temporellement, car une perturbation même subtile d'un de ces processus engendre des malformations congénitales cardiaques (MCCs). En vertu du caractère primordial et indispensable du cœur, la compréhension de l'émergence des diverses malformations cardiaques et des cardiomyopathies est essentielle, et nécessite l'étude détaillée du processus de cardiogénèse.

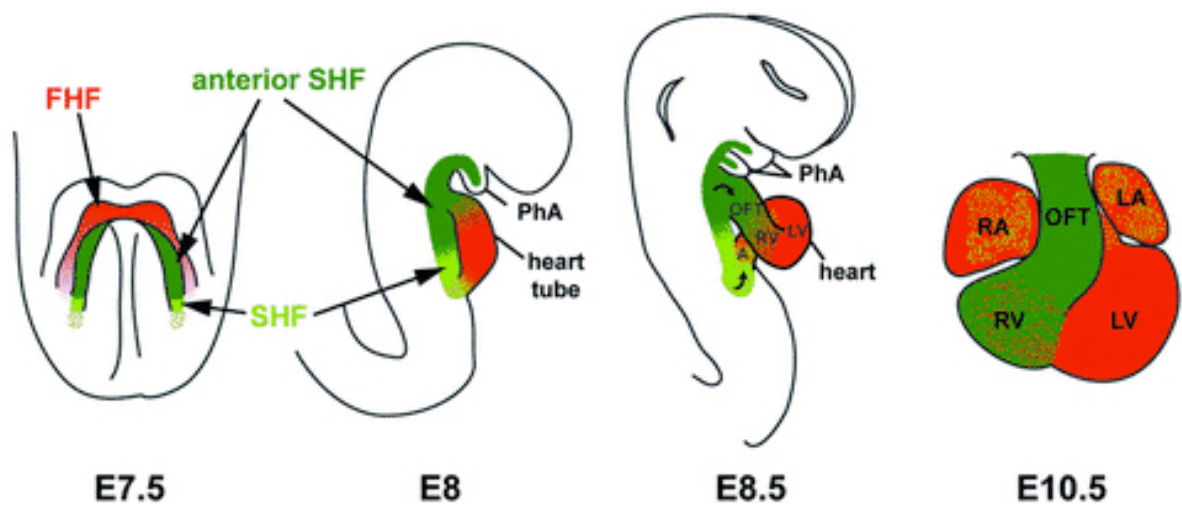
### 1.1.1 Formation du mésoderme cardiaque et du croissant cardiaque

Dès le début de la gastrulation (E6,5 chez la souris), les cellules mésodermiques pré-cardiaques émergent de la région rostrale de la ligne primitive, subséquemment au processus d'ingression des cellules épiblastiques pluripotentes [2-6]. Par la suite, ces précurseurs cardiaques migrent latéro-rostralement de part et d'autre de la ligne médiane du disque embryonnaire, au niveau du mésoderme de la lame latérale, selon deux trajectoires semi-circulaires bilatérales [7, 8]. Lors de la subdivision du mésoderme de la lame latérale en deux feuilletts (feuillet ventral splanchnique et feuillet dorsal somatique), les précurseurs cardiaques siègent uniquement au niveau du mésoderme splanchnique

(mésoderme splanchnopleural ou viscéral) et forment ainsi le mésoderme cardiaque (ou cardiogène), aussi nommé champ cardiaque [9-11]. Les précurseurs présents dans ce champ cardiaque bilatéral contournent la membrane bucco-pharyngée (membrane pharyngienne) pour coloniser l'aire cardiaque qui émerge à l'extrémité crâniale dans le mésoderme splanchnique antérolatéral, antérieurement à la membrane pharyngienne. À E7,5, ces deux régions pré-cardiaques bilatérales, arrangées de part et d'autre de la ligne médiane de l'embryon, fusionnent au niveau de la bordure antérieure de l'aire cardiaque entraînant la formation d'une structure en forme de fer à cheval, appelé le " croissant cardiaque " [3, 12-14]. Les bordures du mésoderme cardiogène entre E7,5 - E8,0 s'étendent de la membrane buccopharyngée au niveau du mésoderme crânial jusqu'au 1<sup>er</sup> somite caudalement selon l'axe antéro-postérieur, tandis qu'elles sont limitées médialement par le mésoderme paraxial et latéralement par le bord du disque embryonnaire [15, 16].

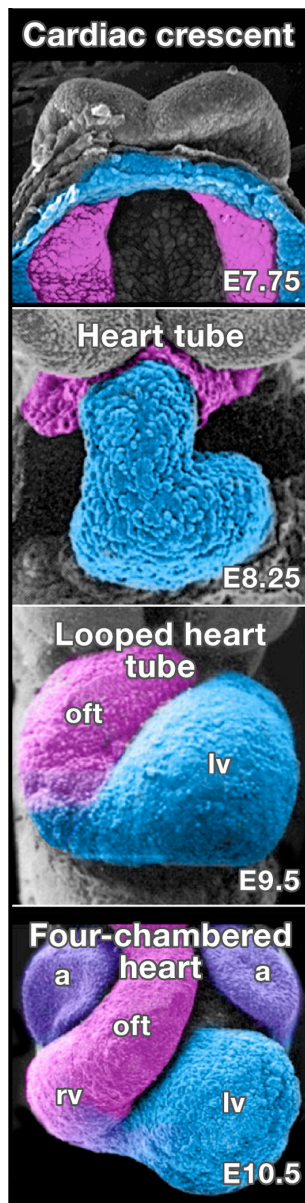
Des études récentes ont mis en évidence qu'au moins deux types de lignées pré-cardiaques sont présentes au stade de développement du croissant cardiaque. En effet, les précurseurs cardiaques provenant de la ligne primitive se subdivisent en deux populations distinctes dès le début de la gastrulation. Il est possible de discerner, à E7,5, la formation des champs cardiaques bilatéraux primaires et secondaires (voir section " 1.1.5 "); le champ cardiaque secondaire (CCS) étant localisé médialement et dorsalement au champ cardiaque primaire (CCP) qui forme le croissant cardiaque [17-19] (Fig. 1.1 et Fig. 1.2). Les cellules du CCP, exprimant spécifiquement *Mlc2a* (*MyI7*) et *Tbx5*, forment le tube cardiaque primitif, tandis que les progéniteurs du CCS exprimant *Islet1* seront ajoutés progressivement au tube cardiaque au niveau des pôles artériels et veineux [20]. La spécification médio-dorsale du CCS diffère donc de la spécification latéro-ventrale du CCP, probablement sous l'influence de différents gradients de morphogènes qui s'intersectent et dont l'intégration spatio-temporelle génère divers microenvironnements inducteurs et/ou permissifs (champs morphogénétiques).





**Fig. 1.1. Contribution cardiaque des champs cardiogènes primaire (CCP) et secondaire (CCS).**

Représentation schématique des champs cardiaques primaire (en anglais, " FHF " : " *First Heart Field* ") (en rouge) et secondaire (en anglais, " SHF " : " *Secondary Heart Field* ") (en vert). Arcs pharyngés (PhA), ventricule droit (RV), et ventricule gauche (LV). (Figure modifiée de [21]).



**Fig. 1.2. Champs cardiogènes primaire (CCP) et secondaire (CCS) durant la cardiogénèse.**

Micrographies obtenues par microscopie électronique à balayage d'embryons de souris à différents stades développementaux, qui exhibent les structures cardiaques dérivées des champs cardiogènes primaire (CCP) (bleu) et secondaire (CCS) (magenta). Les oreillettes (a) et le sulcus inter-ventriculaire, entre le ventricule gauche (lv) et le ventricule droit (rv), dérivent de progéniteurs provenant des deux champs cardiogènes (violet = bleu + magenta). A contrario, le ventricule gauche (lv) dérive uniquement du CCP (bleu), tandis que le tronc artériel (oft) dérive uniquement du CCS (magenta) (Figure modifiée de [22]).

### **1.1.1.1 Induction et répression cardiogénique précoce : établissement du champ morphogénétique cardiaque**

Dès le début de la gastrulation, de multiples signaux proviennent des tissus avoisinants l'itinéraire de migration des cellules mésodermiques pré-cardiaques afin d'assurer la spécification graduelle du mésoderme cardiogène. Ces interactions cellulaires et tissulaires agissent par l'intermédiaire de voies de signalisation, permettant à des signaux d'instruction provenant d'une cellule ou d'un tissu d'induire des changements de comportements des cellules et tissus adjacents [9]. L'intégration spatio-temporelle de ces différents signaux intrinsèques et extrinsèques génère des microenvironnements inducteurs et/ou permissifs (champs morphogénétiques) de la cardiogénèse, dans le mésoderme splanchnique antéro-latéral [23]. Au niveau de ce champ cardiogénique, de nombreux signaux positifs proviennent de l'endoderme cranio-latéral, tandis que des signaux inhibiteurs de la cardiogénèse originent des structures axiales. L'hypoblaste (équivalent aviaire de l'endoderme viscéral de la souris) et l'endoderme antérieur définitif possèdent un fort potentiel d'induction cardiogénique [23-27] et de promotion de la différenciation terminale des cardiomyocytes [27-31], tandis que la région dorsale du tube neural inhibe fortement la cardiogénèse et permet probablement de restreindre l'extension médiale des champs cardiaques [23, 32-34].

#### **1.1.1.1.1 Induction cardiogénique précoce : rôles des BMPs dans la spécification cardiogénique**

Plusieurs études ont prouvé que les membres de la famille des *Tgfβ* sécrétés par l'endoderme cranio-latéral, tels que BMP2/BMP4, agissent sur les récepteurs aux BMPs présents dans le mésoderme précardiaque afin de spécifier le CCP et donc d'induire la formation du tube cardiaque [35]. Le récepteur BMPR1a est essentiel à la spécification du CCP puisque sa délétion entraîne l'absence totale de tube cardiaque chez la souris [35]. Des expériences *in vitro* chez le poulet avaient démontré que BMP2/BMP4 pouvaient induire la formation de cellules cardiogéniques à partir de mésendoderme ventral précoce (HH5) [36] ou de

mésoderme non-précardiaque [37-39]. Chez le poulet, l'implantation entre les stades HH4 et HH8 de cellules exprimant *Noggin*, un inhibiteur des BMPs, au niveau du mésoderme latéral antérieur bloque totalement la cardiogénèse [36]. *In vivo*, les BMPs ne peuvent toutefois pas totalement substituer la fonction de l'endoderme dans l'amplification des facteurs cardiogéniques. Il semblerait que les BMPs et les FGFs agissent de manière synergique afin de garantir une induction cardiogénique complète [39]. Les BMPs sont donc indispensables dans les étapes précoces de l'induction cardiogénique afin de spécifier les cellules mésodermiques en progéniteurs cardiaques et également de maintenir le potentiel cardiogénique de ces cellules jusqu'à ce que d'autres signaux les relaient pour compléter la différenciation des cardiomyocytes [9].

#### **1.1.1.1.2 Induction cardiogénique précoce : rôles des FGFs dans la prolifération / migration des précurseurs cardiaques et dans la spécification cardiogénique**

Les FGFs ont des rôles très précoces dans la spécification, le “ patterning “, la prolifération et la migration des cellules mésodermiques [40-43]. Leur rôle dans l'induction cardiogénique implique des interactions synergiques avec les voies de signalisation des BMPs [39]. Par exemple, FGF4 coopère avec BMP2 afin d'induire la cardiogénèse au niveau de tissus non-précardiaques [39, 44]. FGF8 et FGF4 sont indispensables au niveau de la ligne primitive afin d'induire la migration des cellules. En effet, dans les embryons *Fgf8*<sup>-/-</sup>, les cellules épiblastiques subissent normalement la transition épithélio-mésenchymateuse mais ne peuvent s'éloigner de la ligne primitive afin de former les cellules de l'endoderme et du mésoderme [43]. *Fgf8* est également exprimé au niveau du mésoderme splanchnique antérieur dès E7,75 [45], et de l'endoderme pharyngé où il assure la survie des cellules de la crête neurale en migration, ce qui explique les défauts de septation du tronc aortico-pulmonaire lorsque l'expression de *Fgf8* est dérégulée dans cette région [46-48]. Récemment, des études ont démontré que *Fgf8* est également requis pour la prolifération des progéniteurs cardiaques du CCS. En effet, diverses délétions conditionnelles de *Fgf8* dans les deux champs cardiaques ou uniquement dans le CCS provoquent une diminution significative de la prolifération cellulaire et une

apoptose aberrante au niveau de l'endoderme pharyngé et du mésoderme splanchnique. Ces délétions ont pour conséquence un défaut de " looping " cardiaque dans les cas les plus sévères, ou une hypoplasie du tronc aortico-pulmonaire et du ventricule droit de gravité variable [49, 50]. Les défauts de septations du tronc aortico-pulmonaire (" PTA " : " *Persistent Truncus Arteriosus* " en anglais, ou " TAC " : " Tronc Artériel Commun " en français) et les défauts de rotation et d'alignement des grandes artères cardiaques (" DORV " : " *Double Outlet Right Ventricle* " en anglais, ou " ventricule droit à double sortie " en français ; " TGA " : " *Transposition of the Great Arteries* " en anglais, ou " TGV " : " Transposition des Gros Vaisseaux " en français) sont également observés chez ces mutants conditionnels comme pour les mutants hypomorphes de *Fgf8* [46, 49-51]. En revanche, l'expression de *Fgf8* est inhibée dans la région postérieure mésoderme de la lame latérale par l'acide rétinoïque afin de limiter la prolifération des progéniteurs cardiogènes *Isl1*<sup>+</sup> dans le but de restreindre l'expansion du CCS, et donc de circonscrire la croissance du tronc aortico-pulmonaire [52, 53].

#### **1.1.1.1.3 Induction et répression cardiogénique précoce : rôle biphasique stade-spécifique des voies Wnt**

Des études récentes révèlent un rôle biphasique de la voie de signalisation des Wnt. Avant la gastrulation, la voie canonique *Wnt/β-caténine* participe à l'induction de la spécification et/ou la production de précurseurs mésodermiques cardiaques au niveau de la ligne primitive. Par contre, plus tard dans la gastrulation, cette voie de signalisation inhibe la différenciation des progéniteurs cardiaques au niveau du CCS [35, 54]. L'expression de la *β-caténine* par les progéniteurs mésodermiques cardiogéniques du CCS joue un rôle essentiel dans leur expansion, étant donné que la délétion de la *β-caténine* au niveau du mésoderme n'a aucun effet sur la formation du croissant et du tube cardiaque, mais empêche l'inflexion sigmoïde du cœur. La délétion mésodermique de la *β-caténine* n'affecte donc pas la formation du tube cardiaque ni l'expression des marqueurs du CCP tel que *Tbx5*; par contre, l'expression des gènes spécifiques au CCS, tel qu'*Isl1*, est drastiquement réduite. Au contraire, une étude de gain-de-fonction, résultant de l'expression mésodermique d'un mutant constitutivement

actif de la  $\beta$ -caténine, engendre une hausse de l'expression de *Islet1* et une perturbation sévère dans la formation du tube cardiaque [35]. La voie *Wnt* canonique est donc indispensable, au niveau du CCS, à l'auto-renouvellement et l'expansion des progéniteurs cardiaques. Par contre, l'inhibition de cette voie de signalisation est requise afin de promouvoir la différenciation cardiaque au niveau du CCP. Cette commutation (" switch ") dans l'activité de la voie *Wnt* semble donc s'effectuer consécutivement à l'engagement de ces progéniteurs cardiaques [55].

Juste avant que la gastrulation ne débute, un gradient antéropostérieur d'activité de la voie *Wnt* s'établit donc afin de spécifier les structures antérieures et postérieures; les structures de la région postérieure de l'embryon étant induite par une forte activité des *Wnt*, tandis que les structures de la région antérieure nécessitent une faible activité des *Wnt* afin d'être proprement formées. Des études ont d'ailleurs confirmé que la surexpression ectopique de *Crescent* et *Dickkopf-1* (*Dkk-1*) au niveau du mésoderme postérieur de la lame latérale entraîne la conversion des tissus hématopoïétiques en tissus cardiaques. Au contraire, l'expression ectopique de certains *Wnt* dans la région antérieure au niveau du mésoderme pré-cardiaque induit la formation de tissu hématopoïétique [56]. L'endoderme antérieur et l'intestin antérieur favorisent donc la différenciation cardiaque en inhibant la voie *Wnt* de par leur sécrétion d'inhibiteurs de cette voie de signalisation [57-59]. La diffusion d'inhibiteurs de la voie *Wnt* tels que *Crescent* et *Dkk-1*, exprimés respectivement par l'endoderme antérieur [57] et l'endoderme de l'intestin antérieur [58, 59], établirait une zone de faible activité des *Wnt* au niveau du croissant cardiaque où la différenciation des précurseurs cardiogéniques serait permise [56, 60]. À des stades plus tardifs de l'embryogénèse comme durant la neurulation, le tube neural sécrète certains *Wnt* qui bloquent toute possibilité de cardiogénèse ectopique au niveau du mésoderme paraxial antérieur [32].

#### **1.1.1.1.4 Induction cardiogénique précoce : rôle de la voie Notch**

La production d'un nombre approprié de cellules progénitrices responsable de la formation d'un organe ou tissu implique des interactions réciproques entre des voies de signalisation inductives et répressives. Bien que la convergence de

signaux inductifs puisse être suffisante pour délimiter le nombre de progéniteurs, des signaux opposés peuvent être nécessaires afin de restreindre la spécification et/ou la différenciation myocardique. Des études *in vitro* et *in vivo* sur des souris déficientes de la voie *Notch* semblent indiquer que cette cascade de signalisation inhibe la différenciation initiale des cardiomyocytes suivant leur spécification [61-63], tandis qu'elle n'affecte ni la spécification des progéniteurs cardiogéniques ni la formation du tube cardiaque [64, 65]. Bien que le tube cardiaque des souris déficientes pour la voie *Notch* se développe normalement, la signalisation via *Notch1*, *Notch2* et le ligand *Dll1* sont requis pour la détermination de l'asymétrie droite-gauche et donc pour le "looping" cardiaque [66, 67]. Plus tard dans la cardiogénèse, la voie *Notch* favorise la maturation ventriculaire via la stimulation de la trabéculatation. Dans des cultures de cellules ES *in vitro*, l'activation de la voie *Notch* inhibe la différenciation cardiaque tandis que sa répression favorise le processus de différenciation des cardiomyocytes [63, 68-70]. Ces résultats sont confirmés *in vivo* dans la *Drosophile* et le *Xénope*, puisque les progéniteurs cardiaques adoptent un destin de cellules péricardiques lorsque la voie *Notch* est constitutivement activée [61, 62, 71]. Chez la souris, le phénotype est légèrement moins drastique lorsque le domaine intracellulaire (NICD) de NOTCH1 est surexprimé dans les précurseurs mésodermiques cardiaques *Mesp1*<sup>+</sup>; l'activation constitutive de la voie *Notch* dans ces progéniteurs entraîne la suppression, d'une part de la différenciation des cardiomyocytes du canal auriculo-ventriculaire (canal AV), et d'autre part de la maturation des ventricules [72, 73].

#### **1.1.1.1.5 Induction cardiogénique précoce : rôle de VEGF**

L'endoderme antérieur semble également responsable de la transformation épithélio-mésenchymateuse des cellules pré-endocardiques autorisant ces dernières à ségréger des cellules pro-myocardiques au niveau du mésoderme latéral, entre E7 - E8 (HH5 et HH8 chez le poulet) [74]. Parmi les facteurs paracrines responsables de la formation de l'endocarde, VEGF, exprimé par l'endoderme, est un acteur important de la différenciation des lignées endothéliales. Les modèles de souris knock-out des récepteurs de VEGF (FLK1 et

FLT1) ont d'ailleurs confirmé que VEGF est essentiel à la différenciation des cellules endothéliales [75, 76].

### **1.1.2 Formation du tube cardiaque linéaire primaire**

Chez la souris, entre E7,75 et E8,5, suite à la formation du " croissant cardiaque ", la fusion des deux régions cardiaques bilatérales se prolonge jusqu'à former un tube orienté transitoirement selon l'axe antéropostérieur de l'embryon. Ce tube cardiaque primitif, incomplètement fusionné dans sa portion caudale, apparaît comme un " Y " inversé [12]. Il est composé d'un pôle artériel (voie efférente ou orifice efférent) en position antérieure, et d'un pôle veineux (voie afférente ou orifice afférent) en position postérieure qui comprend le sinus veineux et les deux cornes sinusales correspondant aux deux branches du " Y ". Ce tube comprend également deux couches concentriques de cellules séparées par la gelée cardiaque acellulaire; la monocouche interne rassemblant les cellules endocardiques et la couche externe réunissant des cellules myocardiennes [77].

### **1.1.3 Inflexion sigmoïde cardiaque ou boucle cardiaque (" Looping ")**

À partir de E8,5, le tube cardiaque primaire initie une inflexion sigmoïde vers la droite qui déplace la voie afférente (avec ses deux cornes sinusales et le sinus veineux) rostro-dorsalement, tandis que la voie efférente se courbe vers la droite. Aux étapes précoces de l'inflexion sigmoïde (E8,5 - E9,0), le tube cardiaque forme une boucle qui prend l'apparence d'un " C ", et dont la partie convexe est orientée vers la droite. L'étape suivante (E9,25 - E10,75) se caractérise par la formation d'une hélice immature qui prend l'apparence d'un " S ". Dès cette étape, le tube cardiaque en " S " commence à subir un ballonnement de sa zone ventrale centrale (futur ventricule gauche) et de sa région caudo-latéro-dorsale (futures oreillettes) (voir section " 1.1.3.2 ") [78, 79]. Pendant que le bombement des futurs compartiments myocardiennes se poursuit (E11,0 - E12,75), le cœur termine son inflexion par le déplacement de la région proximale du tronc aortico-pulmonaire vers la gauche pour se placer au-dessus de la partie centrale du canal AV. Cette phase finale du " looping " crée ainsi la juxtaposition des différents segments du



cœur, nécessaire à l'établissement de la double circulation cardiaque [79]. Cette étape est également considérée comme la phase de formation des compartiments myocardiques, car le cœur embryonnaire perd son caractère tubulaire conséquemment au ballonnement (" Ballooning ") des compartiments auriculaires et ventriculaires [78]. D'autres transformations sont discernables à partir de E10,5, telles que l'épaississement du myocarde compact des ventricules et l'apparition de saillies myocardiques, les trabécules, sur la paroi interne des chambres cardiaques.

Durant l'inflexion sigmoïde, l'ébauche auriculaire reste fixée à la paroi dorsale péricardique via sa région médiastinale (mésocarde dorsal), ce qui implique que l'identité gauche/droite de l'oreillette commune est préservée tout au long du " looping ". Par contre, le canal AV, la région bulbo-ventriculaire et le bulbus cordis (bulbe du cœur) subissent une rotation de 90°, conduisant à la transformation respective des parois gauche et droite de ces structures en région ventrale et dorsale du cœur; les parois originellement ventrale et dorsale de ces mêmes structures deviennent respectivement la courbure externe et interne du cœur [78, 79].

#### **1.1.3.1 Croissance du tube et de la boucle cardiaque**

Tôt dans son développement, le tube cardiaque augmente rapidement en taille et en volume résultant de la prolifération cellulaire mais aussi et surtout du recrutement de progéniteurs cardiaques. En effet, outre l'expansion des cellules cardiaques déjà présentes dans le cœur tubulaire [80], des cellules sont progressivement ajoutées aux deux pôles (artériel et veineux) [14]. La prolifération des cardiomyocytes s'accroît progressivement lors du développement et du " looping " du tube cardiaque. Au contraire, la prolifération des cellules endocardiques reste relativement stable au cours de cette même période de développement. La proportion des cellules endocardiques en prolifération durant toute cette période est également plus élevée que celle des cardiomyocytes; et puisque l'endocarde n'est composé que d'une monocouche de cellules tandis que le myocarde est multicouche [80], cela suggère que des cardiomyocytes sont

recrutés au niveau du tube cardiaque afin de compenser leur défaut prolifératif. Depuis, des études ont confirmé cette hypothèse et démontré qu'il s'agit d'ailleurs du mécanisme principal, responsable de la croissance du tube cardiaque [81]. En effet, tôt durant la cardiogénèse, le myocarde primaire, provenant du CCP, semble posséder une capacité proliférative restreinte [81, 82]. Le tube cardiaque s'allonge donc rapidement au niveau du pôle afférent par la différenciation de progéniteurs cardiaques récemment recrutés, et qui proviennent d'un centre prolifératif actif localisé dans la paroi dorsale de la cavité coelomique. Les progéniteurs cardiaques de ce centre prolifératif, positifs pour *Islet1*, migrent également rostralement au niveau du mésoderme péricardique dorsal et se différencient au niveau du pôle artériel du cœur. Les progéniteurs cardiaques sont donc progressivement ajoutés aux deux pôles cardiaques depuis ce centre hautement prolifératif situé caudalement au niveau de la paroi dorsale de la cavité coelomique [81].

#### **1.1.3.2 Morphogenèse durant la formation du tube cardiaque linéaire et de l'inflexion sigmoïde**

Dès sa formation, le tube cardiaque primordial se régionalise sous l'influence de signaux instructifs positionnels selon l'axe antéropostérieur, chaque subdivision étant caractérisée par une signature moléculaire qui lui est propre. Cette régionalisation précoce a mené à l'élaboration du modèle du tube cardiaque primaire pré-segmenté, devenu un paradigme de la cardiogénèse. Toutefois, avec la découverte du CCS qui contribue à la formation du tronc artériel (truncus arteriosus), du ventricule droit et une portion substantielle des oreillettes [20], ce modèle dans lequel le tube cardiaque précoce semblait englober tous les futurs compartiments cardiaques (truncus arteriosus, conus cordis (cône cardiaque), bulbus cordis (bulbe cardiaque), sillon bulbo-ventriculaire, futur ventricule gauche, constriction auriculo-ventriculaire, futures oreillettes) [83] a été substitué par un modèle où seuls sont présents les segments postérieurs dans lesquels se développent respectivement le ventricule gauche et une partie des oreillettes. Le ventricule droit et le truncus arteriosus s'ajoutent progressivement dans la région antérieure de ce cœur tubulaire par le recrutement de progéniteurs du CCS. Déjà d'anciennes études avaient montré que le truncus arteriosus se développait entre

le stade 13 et 22 chez le poulet (E9,25 et E12 chez la souris) à partir de cellules dérivées du mésoderme splanchnique [14, 84-86]. Ces résultats ont été confirmés par trois études concomitantes rapportant que l'élongation du truncus arteriosus [17-19] ainsi que le ventricule droit [16, 87] résultait essentiellement du recrutement de cellules depuis le CCS situé au niveau du mésoderme pharyngé.

Les compartiments myocardiques ne deviennent macroscopiquement visibles qu'à l'étape du " looping " et nécessitent le recrutement abondant de progéniteurs cardiaques depuis le CCS. Le modèle de segmentation du cœur tubulaire n'était donc plus suffisant pour expliquer la cardiogénèse et a donc été affiné par l'introduction de la notion de " ballooning ", qui consiste en l'expansion localisée des chambres myocardiques à différentes positions du tube cardiaque. Le concept de " ballooning " est donc caractérisé par le bombement (ballonnement ou gonflement) des chambres auriculaires au niveau de la région caudo-latéro-dorsale, et des chambres ventriculaires au niveau de la région ventrale du tube cardiaque, ce qui accentue l'inflexion sigmoïde (" looping ") typique que subit le cœur (cœur en forme de " S ") [78, 88]. Ce modèle tient également compte des différences phénotypiques entre le tube cardiaque primaire et les futures chambres contractiles du cœur. Le tube cardiaque primordial, et une des structures qui en dérive (le canal AV), est caractérisé par une faible densité de jonctions " gap " et une conduction lente et uniforme des potentiels d'action, tandis que les chambres myocardiques possèdent une concentration élevée de jonctions " gap " et une conduction électrique rapide [89-94]. En revanche, les régions délimitées au niveau du tube cardiaque primordial ne représentent pas tout à fait les compartiments définitifs du cœur mature étant donné que les frontières entre ces différentes régions semblent dynamiques. Les délimitations entre le myocarde primaire et le myocarde des chambres cardiaques sont modifiées au fur et à mesure du processus de " ballooning ", puisque l'expansion rapide des chambres cardiaques s'effectue au détriment du myocarde primaire (canal AV, courbure interne du cœur, tronc artériel) [95].

Le développement d'un cœur à plusieurs compartiments semble donc suivre un processus qui se subdivise en deux étapes : (1) la première étape se

caractériserait par la formation d'un tube cardiaque primordial partiellement régionalisé, qui diffère légèrement du modèle du tube cardiaque pré-segmenté de par l'absence des segments sensés représenter le ventricule droit et le tronc artériel, étant donné que ces structures cardiaques ne sont pas englobées dans le tube cardiaque primitif, et se développent seulement ultérieurement au niveau de la région antérieure du cœur tubulaire, tandis que (2) la deuxième étape impliquerait la différenciation localisée des compartiments myocardiques le long de l'ébauche cardiaque tubulaire régionalisée (modèle du "ballooning") via la prolifération orientée de cardiomyocytes [96], la croissance cellulaire régionalisée [82], et le recrutement, temporellement et spatialement orchestré, de progéniteurs cardiaques depuis le CCS [16-20, 97]. Ces deux étapes successives nécessitent un "patterning" antéropostérieur, dorso-ventral ainsi qu'une latéralisation gauche-droite du tube cardiaque (CCP) afin de pourvoir les informations positionnelles cruciales à la formation de microenvironnements, au niveau desquels le bombement des différents compartiments myocardiques peut s'accomplir [78, 88].

#### **1.1.3.2.1 "Patterning" antéro-postérieur du tube cardiaque**

De nombreuses études de filiation cellulaire chez le poulet semblaient mettre en évidence que la polarité cranio-caudale des progéniteurs cardiaques retrouvée au niveau du tube cardiaque linéaire primitif était en direct corrélation avec la région où les cellules épiblastiques traversaient la ligne primitive. Les cellules épiblastiques de la région rostrale de la ligne primitive (portion 2/3 antérieure) contribuaient aux régions du tube cardiaque selon une polarité rostro-caudale, c'est-à-dire que les cellules les plus rostrales migrent dans la région antérieure du tube cardiaque linéaire alors que les cellules caudales de cette portion antérieure de la ligne primitive colonisent la région postérieure du tube cardiaque [2, 5, 14, 98]. Les premières études examinant l'origine des cellules du système cardiovasculaire au niveau de la ligne primitive semblaient donc suggérer qu'il existait une séquence rostro-caudale, c'est-à-dire que la polarité rostro-caudale était également synchronisée temporellement avec le stade auquel ces cellules traversent la ligne primitive. Les cellules épiblastiques subissant une ingression au stade précoce de formation de la ligne primitive, dans la région rostrale de cette

dernière, donneront naissance aux cellules du tronc aortico-pulmonaire, tandis que les cellules traversant la ligne primitive plus tardivement deviendront dans l'ordre les cellules des ventricules puis celles du sinus veineux [7]. Enfin, les cellules épiblastiques qui formeront les régions ventrales du cœur traversent légèrement plus précocement la ligne primitive que les cellules des régions dorsales et ce pour chaque structure positionnée le long de l'axe antéropostérieur du tube cardiaque [7]. Des études subséquentes ont toutefois contesté ces observations et concluent de leurs propres résultats que bien qu'il existe une polarité rostro-caudale similaire entre la ligne primitive et le tube cardiaque, les cellules épiblastiques des différents niveaux de la ligne primitive subissent une ingression concomitante entre HH3 et HH3+. Ces études de transplantations ont également démontré que les cellules à chaque niveau de la ligne primitive génèrent tous les différents types de cellules cardiaques (myocardiques, endocardiques...) à la position correspondante du tube cardiaque selon l'axe antéro-postérieur [2, 5, 99].

Quelques études récentes chez le poulet [100, 101], la caille [102], et la souris [1] ont toutefois remis en question cette conservation de polarité antéropostérieure entre la ligne primitive et le tube cardiaque et ont inféré de leurs propres résultats que cette organisation antéropostérieure émerge seulement au stade du croissant cardiaque. L'une de ces études a effectué une analyse clonale rétrospective de cellules myocardiques grâce à une souris  $\alpha$ -actine cardiaque *nlaacZ*. Suite à un évènement de recombinaison intragénique rare dans une cellule, produisant un allèle *nlacZ*, il y a création d'un clone cellulaire myocardique exprimant la  $\beta$ -galactosidase. Lorsqu'un évènement de recombinaison intervient avant la formation du croissant cardiaque, les cellules filles issues d'un clone unique sont parfois dispersées sur l'ensemble de l'axe antéropostérieur du tube cardiaque. Ce résultat est donc incompatible avec un modèle dans lequel chaque futur compartiment cardiaque est pré-ordonné au niveau de la ligne primitive [1]. Cette polarité antéropostérieure est donc imposée par des signaux positionnels et ne semble déterminée qu'à partir de HH7 - HH8 (E7,5 - E8), au stade du croissant cardiaque [103-105].

Durant leur migration latéro-rostrale, les progéniteurs cardiaques sont instruits par des signaux positionnels le long de l'axe antéropostérieur (cranio- ou rostro-caudal) et cela même avant la formation du tube cardiaque primordial [106]. Parmi ces signaux, l'acide rétinoïque joue le rôle d'un morphogène, qui participe à cette polarisation antéropostérieure. L'excès d'acide rétinoïque entraîne une postériorisation du tube cardiaque, caractérisée par une expansion des marqueurs (ex : *Amhc1*) de la région postérieure vers la région antérieure [107-110]. Réciproquement, la déficience en acide rétinoïque cause un sous-développement des structures postérieures du cœur, en particulier le sinus veineux et les oreillettes [111, 112]. Le patron d'expression de l'une des enzymes responsables de la synthèse de l'acide rétinoïque, la rétinaldéhyde déhydrogénase de type 2 (*Raldh2*) [113], coïncide avec la polarité antéropostérieure du croissant et du tube cardiaque [114-116]. Deux phases de signalisation antéropostérieure par l'acide rétinoïque sont reflétées par l'expression de *Raldh2*. Dans la première phase, entre HH4 et HH7 (E6,75 - E7,5), la *Raldh2* est exprimée dans la région postérieure du nœud de Hensen, puis son expression s'étend légèrement et antérieurement, à partir de HH6, vers le mésoderme latéral antérieur. La deuxième phase, de HH7 à HH9 (E7,5 - E8,25), se caractérise par l'expansion caudo-rostrale d'une vague d'expression de *Raldh2* qui suit deux trajectoires semi-circulaires bilatérales chevauchant précisément les régions postérieures des itinéraires de migration des progéniteurs cardiaques [117]. L'expression de *Raldh2* colocalise ultimement dans la région postérieure du tube cardiaque avec celle de *Amhc1* et de *Tbx5* [116, 118].

La fonction de *Raldh2* dans la spécification de l'identité antéropostérieure a été confirmée par l'étude des souris *Raldh2*<sup>-/-</sup>. Ces souris meurent *in utero* vers E10 alors que leur cœur exhibe une incapacité à s'infléchir ("looping"), une hypoplasie sévère des structures postérieures (sinus veineux et oreillettes), et une différenciation précoce des cardiomyocytes ventriculaires [115, 119], ce qui conforte l'hypothèse que l'acide rétinoïque intervient dans la spécification et la détermination de l'identité antéropostérieure. Il est donc possible d'établir un modèle dans lequel les progéniteurs cardiaques en migration latéro-rostrale échappent à l'influence de l'acide rétinoïque à HH4 (E6,75), puis ils sont lentement

spécifiés par un accroissement graduel de l'acide rétinoïque selon un gradient caudo-rostral, jusqu'à HH7 (E7,5). À partir de HH7, l'acide rétinoïque augmente promptement et détermine l'identité postérieure des progéniteurs cardiaques [117, 120, 121], ce qui coïncide d'ailleurs avec la détermination de la polarité antéropostérieure des champs cardiogéniques entre HH7 et HH8 (E7,5 - E8,0) précédemment décrite [103-105, 117].

Originellement, l'acide rétinoïque semblait uniquement réguler l'identité antéropostérieure des progéniteurs cardiaques du CCP. Depuis, des études ont mis en évidence que l'acide rétinoïque possède également une autre fonction, celle de restreindre le pool de progéniteurs cardiogéniques [122] dans la région postérieure du CCS [52, 53]. L'établissement de la polarité antéropostérieure, qui résulte d'une vague caudo-rostrale d'expression de *Raldh2*, permet donc également de contrôler la formation du CCS. La contribution de cellules aux deux pôles cardiaques depuis le CCS est perturbée lors d'une déficience en acide rétinoïque. Dans les souris *Raldh2*<sup>-/-</sup>, les marqueurs du CCS (*Isl1*, *Fgf8*, *Fgf10*, *Tbx1*) s'étendent postérieurement, la différenciation des progéniteurs est compromise, le pôle veineux est sévèrement désorganisé, et le tronc aortico-pulmonaire est absent [52]. Finalement, il semble que l'acide rétinoïque limite le pool de progéniteurs cardiaques du CCS postérieurement en réprimant FGF8 [52, 53].

#### **1.1.3.2.2 " Patterning " dorso-ventral du tube cardiaque**

Lors de la formation du tube cardiaque, la région dorsale de cette structure reste en contact avec le mésocarde dorsal (région dorsale de la cavité péricardique). Durant l'inflexion cardiaque (" looping "), cette région dorsale du tube cardiaque se désolidarise du mésocarde dorsal, à l'exception des pôles artériel et veineux, et forme la courbure cardiaque interne au niveau de sa portion antérieure. À l'opposé, la région ventro-rostrale (futur ventricule gauche) et la région dorso-caudale (futures oreillettes) du tube cardiaque forme la courbure externe du cœur au niveau de laquelle les chambres myocardiques se façonneront par le processus de ballonnement. Seuls quelques marqueurs permettent de

distinguer l'axe dorso-ventral du cœur. C'est le cas de *Hand1* (*eHand*) qui, entre E8,0 - E8,5, s'exprime spécifiquement au niveau de la zone ventrale du tube cardiaque d'où dérivera le ventricule gauche. Après l'inflexion cardiaque, *eHand* se confinera sur la région gauche du canal AV ainsi qu'au niveau de la courbure cardiaque externe des ventricules et du tronc aortico-pulmonaire; son expression diminuant toutefois rapidement au niveau du future ventricule droit entre E8,5 - E9,5 [78, 123, 124]. Les souris *Hand1*<sup>-/-</sup> meurent très tôt, entre E8,5 - E9,5, d'un défaut d'expansion et d'inflexion du tube cardiaque [124, 125]. Les cœurs des souris chimériques composées de cellules ES *Hand1*<sup>-/-</sup> et de cellules ES sauvages (*Rosa26-LacZ*) ne sont générés qu'à partir de cellules sauvages, ce qui confirme que *Hand1* joue un rôle cellule-autonome important dans la morphogenèse de la zone ventrale du tube cardiaque [126].

D'autres gènes possèdent des patrons d'expression qui suivent une polarité dorso-ventrale. Parmi ces gènes, *Nppa* est exprimé précocement vers E8,0 au niveau de la frontière médio-latérale du croissant cardiaque en fusion, puis sur la paroi ventrale du tube cardiaque en formation. Ce patron d'expression semble suggérer que la signalisation médio-latérale précède le " patterning " dorso-ventral. Le patron d'expression de *Nppa* est ensuite restreint à la courbure cardiaque externe, puis confiné aux chambres myocardiques [78, 127, 128]. *Chisel* et *Cited1* (*Msg1*) sont également exprimés au niveau de la paroi ventrale du tube cardiaque dès E8,25. Après l'inflexion cardiaque, l'expression de ces gènes est circonscrite aux chambres myocardiques [129, 130]. L'expression ventrale de ces gènes, puis spécifiquement au niveau de la courbure externe est restreinte aux chambres myocardiques, à l'exception de *Hand1*. Cette corrélation suggère une relation forte entre le " patterning " dorso-ventral et la formation de la courbure externe du cœur [88]. Comme indiqué dans la section " 1.1.3 ", le canal AV, la région bulbo-ventriculaire et le bulbus cordis (bulbe du cœur) subissent une rotation de 90°, aboutissant à la transformation respective des parois originellement ventrale et dorsale de ces structures en courbure externe et interne du cœur [78, 79].

#### **1.1.3.2.3 Latéralité gauche/droite du tube cardiaque**



L'établissement d'une asymétrie gauche/droite est indispensable à l'agencement des différents organes dans l'embryon. Cette identité gauche/droite s'édifie dès la gastrulation et dépend de signaux instructifs qui dérivent du nœud de Hensen [131]. Des aberrations dans la détermination de l'identité gauche/droite durant l'embryogénèse engendrent un large spectre d'anomalies de latéralité (*situs inversus*, *situs solitus*, *situs ambigu* ...), qui, lorsqu'elles affectent l'aire cardiogénique, causent une incidence plus élevée de MCCs. C'est pourquoi, les mécanismes de latéralisation durant la cardiogénèse sont étudiés. Des expériences dans lesquelles des précurseurs cardiogéniques étaient marqués par la thymidine tritiée d'un côté de l'embryon ont mis en évidence que la contribution cellulaire au tube cardiaque est asymétrique. En effet, à E8,5 (HH10<sup>-</sup>), davantage de progéniteurs du champ cardiaque de droite ont contribué au cœur tubulaire. À E8,75 (HH11), cette latéralisation droite se maintient dans la région antérieure du tube cardiaque, mais commence à s'inverser dans la région caudale bulbo-ventriculaire. Vers E9,0 (HH12), la prédominance des progéniteurs cardiaques de droite n'est plus significative dans la région antérieure, tandis que les précurseurs du champ cardiogénique gauche contribuent davantage à la région caudale bulbo-ventriculaire [100, 132]. Similairement, une contribution asymétrique des champs cardiaques droite et gauche semble également intervenir durant la cardiogénèse chez le poisson zèbre, bien que des divergences soient observées dans le positionnement final de ces différents progéniteurs cardiogéniques au niveau du tube cardiaque par rapport aux vertébrés supérieurs [133]. Cette asymétrie suggère qu'une différence entre le potentiel développemental des champs cardiaques droite et gauche participe au processus de "looping" et à la latéralisation du cœur chez les vertébrés supérieurs.

Des gènes sont déjà exprimés de façon asymétrique au stade où le champ cardiaque primaire est formé. La *Fibrillin-2* est exprimée dans le champ de droite [134, 135] tandis que *hLAMP-1* [135], la *Flectin* [136] et *Pitx2c* [137, 138] sont exprimés dans le champ cardiaque de gauche. Dans le cas de *Pitx2c*, son expression est sous l'influence de *Nodal*, membre de la famille *Tgfβ*, et un des marqueurs les plus précoces de la détermination de l'identité gauche/droite puisqu'il est seulement exprimé du côté gauche de l'embryon [139-141]. Les souris

*Pitx2*<sup>-/-</sup> présentent une multitude de phénotypes dont des malformations cardiaques qui se classent parmi les défauts de latéralisation ou hétérotaxie, tels que les DORV, TGV, et CIA/CIV [142-145]. Finalement, l'asymétrie gauche/droite est présente à la fois dans le CCP et le CCS. Récemment, une étude a montré que les progéniteurs de la région postérieure du CCS à gauche et à droite contribuent respectivement à l'oreillette gauche et droite. Ces progéniteurs cardiaques acquièrent leur identité gauche/droite à partir de E8,0, période à laquelle l'expression de *Pitx2c* est initiée à gauche. *Pitx2c* semble donc jouer un rôle dans la détermination de l'identité gauche des progéniteurs du CCS postérieur de la future oreillette gauche [146].

#### **1.1.4 Septation (cloisonnement) et maturation des chambres cardiaques**

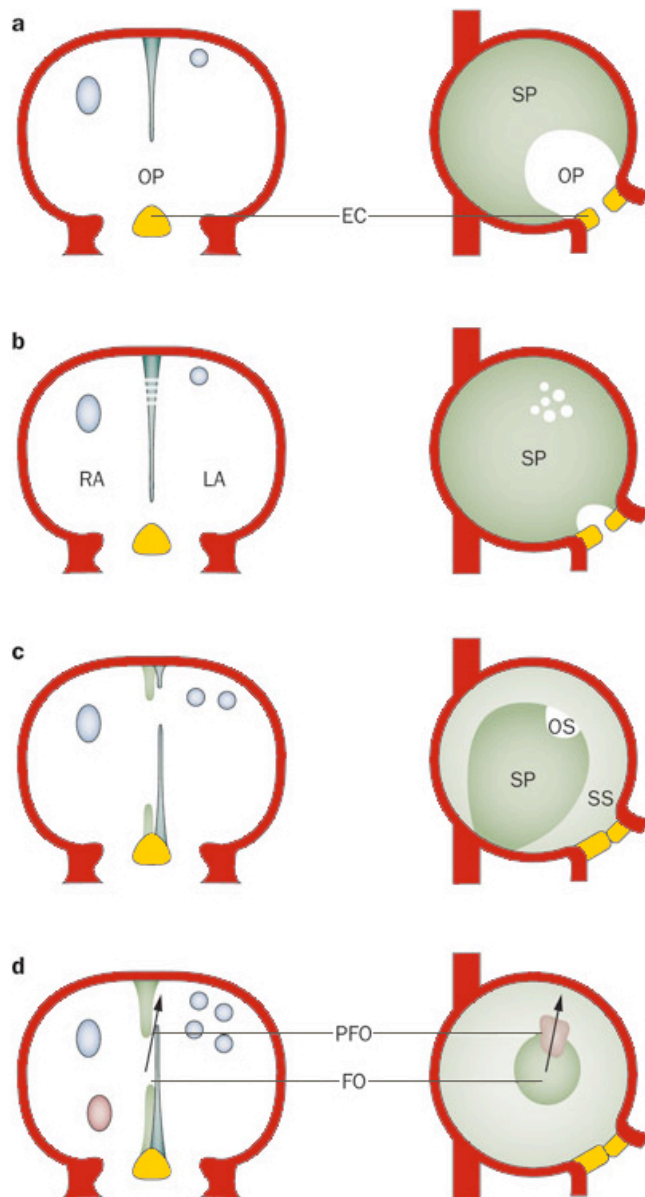
Consécutivement à la phase finale du " looping " (E11 - E13), l'étape de maturation des chambres cardiaques s'enclenche (E13 - E15,5). Durant cette phase, la septation des oreillettes, des ventricules, du canal AV et du tronc auriculo-pulmonaire (truncus arteriosus) se complètent. Bien que cette étape soit considérée comme celle de la septation cardiaque, il est important de noter que les premières ébauches des septums auriculaires et ventriculaires sont visibles dès E10, durant l'étape intermédiaire du " looping ". La septation cardiaque permet de passer d'un flux sanguin sériel à une circulation parallèle grâce à la séparation définitive des compartiments pulmonaires à droite et systémiques à gauche. La circulation pulmonaire (petite circulation) assure la ré-oxygénation du sang par les poumons, tandis que la circulation systémique (grande circulation) fournit l'oxygène et les nutriments à l'ensemble des tissus de l'organisme.

##### **1.1.4.1 Septation (cloisonnement) auriculaire**

Le cloisonnement auriculaire débute vers E9,75 avec la pénétration de tissu extracardiaque au niveau de la voûte dorsale de l'oreillette primitive. Ce tissu mésenchymateux extracardiaque dérivé du CCS forme par différenciation mésenchymo-myocardique le rudiment d'une cloison musculaire médiane qui a l'aspect d'un croissant. Cette structure nommée le septum primum est recouvert

d'un capuchon mésenchymateux provenant de la TEM des cellules endocardiques tapissant cette cloison rudimentaire [147-149]. Pendant la croissance du septum primum, la crête vestibulaire, structure également dérivée du mésocarde dorsal, progresse caudalement vers le bourrelet endocardique inférieur [149-152]. Progressivement, le septum primum s'étend cranialement de la voûte dorsale de l'oreillette jusqu'aux bourrelets endocardiques du canal AV (Fig. 1.3). La communication entre les ébauches des oreillettes droite et gauche sous ce septum primum est nommée le foramen primum (ostium primum); ce dernier s'amenuise puis achève sa fermeture par la fusion du capuchon mésenchymateux avec le bourrelet endocardique supérieur du canal AV et l'agrégation de crête vestibulaire avec le bourrelet endocardique inférieur, vers E10,5. Immédiatement après l'occlusion du foramen primum, les bourrelets endocardiques supérieur et inférieur entament leur fusion afin d'ultimement séparer les connections auriculo-ventriculaires droite et gauche. À la droite du septum primum se forme le septum secundum, qui est constitué en réalité d'une invagination et non d'un septum, de la voûte dorsale de l'oreillette primitive, à la frontière précise entre les futures oreillettes droite et gauche. En effet, le septum primum est en réalité une structure d'identité gauche car elle exprime *Pitx2c* et *CK-B*, tandis que le septum secundum marque la frontière entre les oreillettes droite et gauche [153]. Durant ce temps, des fenestrations émergent via le processus d'apoptose dans la portion crâniale du septum primum et forme une communication inter-auriculaire nommée le foramen secundum (ostium secundum). Le septum secundum, quant à lui, couvre une partie du foramen secundum et constitue finalement la bordure céphalo-dorsale (*limbus*; limbe ou anneau de la fosse ovale) de ce dernier. La communication de forme ovale entre les oreillettes droite et gauche qui résulte du recouvrement partiel de l'ostium secundum par le septum secundum est nommée le foramen ovale (*fossa ovalis*; trou ou canal de Botal). En regard de cet orifice résiduel, le bord libre du septum primum au niveau de l'ostium secundum tend à obturer le canal de Botal en agissant comme une valve anti-reflux, nommée la valvule du foramen ovale (ou valvule de Vieussens) [153, 154]. Puisque l'orifice de la veine cave caudale (inférieure) au niveau de l'oreillette droite demeure en vis-à-vis du canal de Botal, une proportion du sang en provenance du placenta dévie directement de l'oreillette droite à celle de gauche (shunt droite-gauche) afin de

court-circuiter les poumons non-fonctionnels jusqu'à la naissance, constituant ainsi la circulation sanguine fœtale.



**Fig. 1.3. Développement du septum inter-auriculaire durant la cardiogénèse.**

**(a)** Le septum primum (SP) débute sa croissance vers E9,75 au niveau de la voûte dorsale de l'oreillette primitive, puis progresse jusqu'aux bourrelets endocardiques (EC) du canal AV. La communication entre les ébauches des oreillettes droite (RA) et gauche (LA) sous ce SP est nommée l'ostium primum (OP). **(b)** Le OP s'amenuise puis achève sa fermeture par la fusion du capuchon mésenchymateux du SP avec les EC du canal AV vers E10,5. Durant ce temps, des fenestrations

émergent par apoptose du tissu myocardique de la portion crâniale du SP et forme une communication inter-auriculaire nommée le ostium secundum (OS). **(c)** À la droite du SP se forme le septum secundum (SS) (invagination de la voûte dorsale de l'oreillette primitive). **(d)** Au niveau de la portion antéro-supérieure du foramen ovale (FO), le bord libre du SP au niveau de l'ostium secundum (OS) tend à obturer le FO en agissant comme une valve anti-reflux, nommée la valvule du foramen ovale et constitue le foramen ovale persistant (PFO) chez l'adulte si la valvule du foramen ovale ne fusionne pas avec le septum secundum (SS) après la naissance. La flèche représente la direction d'écoulement du sang de l'oreillette droite vers l'oreillette gauche (Figure modifiée de [155]).

Après la naissance, l'expansion des poumons suite à l'instauration de la respiration est accompagnée d'une diminution drastique de la pression pulmonaire, ce qui autorise l'établissement de la circulation dans les capillaires pulmonaires. La diminution de la pression pulmonaire est suivie d'une réduction de la pression sanguine dans l'oreillette droite par rapport à l'oreillette gauche. Cette inversion des pressions dans les oreillettes force l'apposition du septum primum contre le septum secundum, fermant ainsi fonctionnellement le foramen ovale. Chez l'humain, la portion caudale du septum primum et la région crâniale du septum secundum adhèrent de façon permanente au cours de la première année de vie dans approximativement 75% des individus. Toutefois, 25% de la population humaine présente une condition nommée foramen ovale perméable persistant (FOP), qui résulte de l'absence d'adhésion totale ou partielle entre le septum primum et secundum [156-159]. Les FOPs sont généralement hémodynamiquement bénins, bien qu'une corrélation significative existe entre les FOPs et les accidents vasculaires cérébraux ischémiques de cause inconnue (accident vasculaire cérébral cryptogénique), qui résulte probablement d'une embolie paradoxale au cours de laquelle un thrombus (caillot sanguin) d'origine veineuse traverse le FOP directement dans la circulation systémique artérielle jusqu'à bloquer une artère au niveau d'un tissu [158]. Les FOPs semblent également favoriser d'autres affections sévères telles que les migraines avec aura

[159-161], les embolies paradoxales, les hypoxémies (désaturations) orthostatiques chez les patients atteints du syndrome rare de platypnée-orthodéoxie, les hypoxémies réfractaires causées par des shunts droit-gauche chez les patients atteints d'infarctus du ventricule droit ou de maladies pulmonaires sévères, les accidents de décompression neurologique chez les plongeurs, les ictus amnésiques, le syndrome d'apnées du sommeil, ainsi que les oedèmes pulmonaires causées par le déficit d'oxygène dans l'air inspiré en haute altitude [162].

#### **1.1.4.2 Septation (cloisonnement) ventriculaire**

Pendant que l'oreillette primitive se divise grâce à un cloisonnement inter-auriculaire en une oreillette droite et gauche, le ventricule primitif subit également une séparation via un septum inter-ventriculaire. Vers E11, une cloison musculaire (septum inferius) émerge depuis l'apex du cœur au niveau du sillon bulbo-ventriculaire suite à la fusion de trabécules ventriculaires, et s'étend ensuite graduellement en direction des bourrelets endocardiques du canal AV. L'orifice entre l'apex du septum ventriculaire musculaire primaire et les bourrelets est nommé le foramen ventriculaire (ou ostium ventriculaire) [154]. La complétion de ce cloisonnement vers E16 est assurée d'une part par la cloison du tronc artériel et d'autre part par l'allongement du septum membraneux (septum intermedium ou septum membranaceum) depuis les bourrelets endocardiques du canal AV qui rejoint le septum inferius musculaire [154, 163].

#### **1.1.4.3 Septation (cloisonnement) du canal auriculo-ventriculaire**

Les deux bourrelets endocardiques principaux (coussins endocardiques) inférieur (dorsal) et supérieur (ventral) se développent dès E9,25 au niveau de la constriction auriculo-ventriculaire où ils sont diamétralement opposés. Le bourrelet antéro-supérieur constituera principalement le futur feuillet aortique de la valve mitral, tandis que le bourrelet postéro-inférieur contribue en majorité au feuillet septal de la valve tricuspide. Peu de temps après le développement des bourrelets principaux émergent les bourrelets latéraux droits et gauches, qui formeront

respectivement les feuillets muraux des valves tricuspide et mitrale. L'ensemble de ces bourrelets endocardiques du canal AV sont gorgés de cellules mésenchymateuses qui émergent dès E9,5 par le phénomène de TEM des cellules endocardiques tapissant la paroi interne du canal AV [164]. L'expansion/déviations graduelle du canal AV vers la droite assure la juxtaposition de chaque oreillette avec son ventricule respectif et permet donc au sang de se déverser dans les deux ventricules, à la place de ne parvenir qu'au ventricule gauche. La croissance des bourrelets endocardiques principaux entraîne leur rapprochement l'un vers l'autre. À partir de E13, ils débutent leur fusion au centre de la lumière du canal AV, ce qui a pour conséquence de diviser définitivement le canal AV en deux vers E14, formant ainsi les orifices (ou canal) auriculo-ventriculaires droit et gauche où se développeront respectivement les valves tricuspide et mitrale [154, 164]. Des travaux récents démontrent également que la septation auriculo-ventriculaire requiert la contribution de deux structures mésenchymateuses additionnelles, que sont le capuchon mésenchymateux du septum primum qui fusionne avec le bourrelet antéro-supérieur, et la protrusion (protubérance) du mésocarde dorsal qui s'agrège avec le bourrelet postéro-inférieur [147-152]. Finalement, des cellules dérivées des crêtes neurales (ectomésenchyme) semble également participer à la fois à la formation des valves du canal AV et au développement du système de conduction cardiaque [165].

#### **1.1.4.4 Septation (cloisonnement proximale et bipartition distale) du tronc artériel**

Durant l'élongation du conotruncus par le recrutement de progéniteurs du CCS entre E8,25 et E10,5 [17, 18, 166] se développe, similairement au canal AV, des bourrelets endocardiques (pariétal et septal) diamétralement opposés et remplis de gelée cardiaque à E9,5. Au fur et à mesure de leur développement, la portion proximale (conus ou cône de la voie efférente) des bourrelets endocardiques (bourrelets conotroncaux) se discernent progressivement de la portion distale (truncus ou tronc) en forme d'arêtes de ces mêmes bourrelets endocardiques (bourrelets aortico-pulmonaires), tant au niveau morphologique que de l'origine des cellules mésenchymateuses qui colonisent ces structures. Toutefois, d'autres

études relatent de l'existence de deux paires distinctes de bourrelets endocardiques, l'une dans la portion proximale et l'autre dans la portion distale du conotruncus [167]. Ces différences descriptives ne sont pas encore résolues. Hormis leurs différences morphologiques, les bourrelets endocardiques diffèrent également longitudinalement de par l'origine des cellules qui colonisent les régions proximale et distale du conotruncus. En effet, les bourrelets endocardiques du cône sont envahis par les cellules mésenchymateuses dérivant du CCS et de la TEM des cellules endocardiques, tandis que les arêtes du troncus sont colonisées par les cellules du CCS et des cellules des crêtes neurales [164, 168]. Entre-temps, la paroi myocardique du troncus arteriosus subit une rotation lévogyre d'approximativement  $180^\circ$  [169-172] entraînant également le futur septum aortico-pulmonaire à réaliser la même rotation, d'où la désignation de septum spiralé donné à cette cloison [173, 174]. Ce mouvement de rotation participe ultimement au positionnement des gros vaisseaux avec d'une part la connexion entre le ventricule droit et le tronc pulmonaire (artère pulmonaire), et d'autre part le ventricule gauche et l'aorte. Vers E12,5, la fusion des deux bourrelets endocardiques proximaux se déclenche, tandis que l'invasion des cellules dérivées des crêtes neurales amorce la fusion des deux arêtes du tronc, et la formation des feuillets des valves semi-lunaires de l'aorte et du tronc pulmonaire. La septation de la région proximale du troncus arteriosus se caractérise par la formation d'une cloison (septum conotroncale) qui fusionne avec le septum intermedium du canal AV, tandis que la septation de la région distale (septum aortico-pulmonaire) entraîne la bipartition du tronc artériel en artère pulmonaire et aorte. Les valves de l'aorte et de l'artère pulmonaire initient leur formation vers E12,5 à la jonction du septum conotroncale et du septum aortico-pulmonaire. En outre, le tissu mésenchymateux de la portion proximale du septum est substitué par des cardiomyocytes par un mécanisme encore peu connu. Deux modèles sont proposés, le premier implique la myocardisation du septum qui consiste en l'invasion du tissu mésenchymateux par des cardiomyocytes générés par la prolifération des cellules myocardiques de la paroi adjacente, tandis que le deuxième modèle propose une transdifférenciation mésenchymo-myocardique des cellules mésenchymateuses des bourrelets endocardiques [175]. Le premier modèle semble privilégié par des études de cartographie de filiation cellulaire qui



démontrent que ni les cellules des crêtes neurales ni les cellules dérivées de l'endocarde ne peuvent se différencier en cardiomyocytes [176, 177]. Une question encore irrésolue réside toutefois dans l'inscience des mécanismes qui régulent le compartimentage de ces lignées cellulaires d'origines différentes (cellules endocardiques et cellules des crêtes neurales) [164].

### **1.1.5 Origine et diversité des populations de progéniteurs cardiogènes**

La cardiogénèse requiert un recrutement précisément coordonné de multiples populations de progéniteurs cardiaques d'origines diverses. La compréhension du développement cardiaque nécessite donc d'identifier les origines, les spécifications progressives et les fonctions de ces différentes populations cellulaires. Parmi les stratégies expérimentales adoptées afin d'atteindre ces objectifs, certaines ont permis de réaliser une topographie tridimensionnelle tissulaire du mésoderme cardiaque à chaque stade de l'embryogénèse en employant conjointement des transplantations de tissu cardiaque ou cardiogénique et des cultures d'explants tissulaires d'embryons. Plus récemment, des techniques de transgénèse et de recombinaison homologe pour suivre le destin de progéniteurs cardiaques et/ou effectuer des mutations/délétions, nulles ou conditionnelles, ont été entreprises dans le but d'étudier la fonction d'un ou plusieurs gènes d'intérêts impliqués dans la cardiogénèse. Toutes ces stratégies ont mis en évidence que le mésoderme cardiogène est un tissu extrêmement dynamique dans lequel les cellules changent rapidement de position et de filiation sur une très courte période de temps, et qui convergent finalement de façon coordonnées pour former les différentes structures du cœur.

Durant l'embryogenèse, les progéniteurs cardiaques traversent progressivement une série d'étapes de filiation cellulaire qui dépendent davantage de l'environnement tissulaire dans lequel migrent ces précurseurs cardiaques que d'un programme développemental inhérent à ces derniers. Il existe grossièrement quatre étapes successives de filiation cellulaire : la spécification (état réversible) progressive des précurseurs cardiaques mésodermiques, la détermination (état irréversible) des précurseurs cardiaques au niveau du champ cardiaque primaire,

le " patterning " des champs cardiaques et enfin la différenciation des cardiomyocytes [178].

Suite à la génération de cellules mésodermiques, marquées par l'expression de *Brachyury*, la spécification des progéniteurs cardiovasculaires et hématopoïétiques peut être respectivement identifiée par l'expression de *Mesp1* [179-181], *Mesp2* [181], et *Flk1* [182, 183]. Hormis *Mesp1* et *Flk1*, les facteurs responsables de la spécification et de la détermination des progéniteurs cardiaques sont encore mal connus. Au fur et à mesure de leur migration vers la région céphalique du disque embryonnaire, les progéniteurs cardiaques se différencient, puisque des expériences de cartographie de filiation cellulaire ont confirmé que le profil d'expression du marqueur cardiaque *Nkx2.5* ne chevauche que la portion antérieure du croissant cardiaque [100]. Afin de réaliser la dissection de la hiérarchie transcriptionnelle gouvernant la spécification et la détermination des différentes lignées cardiovasculaires, des études ont été effectuées sur la différenciation des cellules souches embryonnaires pluripotentes en cellules cardiaques. Malgré l'absence d'organisation spatiale tissulaire, permettant l'établissement de gradients morphogénétiques essentiels à l'embryogenèse *in vivo*, la différenciation *in vitro* des cellules souches embryonnaires pluripotentes récapitule de nombreux événements indispensables à l'induction des feuillets germinaux, et à la différenciation des lignées cellulaires. En effet, la différenciation des cellules souches embryonnaires exhibent une conservation remarquable de la séquence temporelle de l'expression génique requis au déclenchement de la spécification et détermination cellulaire. Les études récentes employant les cellules souches embryonnaires additionnées aux connaissances déjà accumulées sur les voies d'induction des progéniteurs cardiaques ont permis de décrire l'existence d'un rôle biphasique de la voie de signalisation des *Wnt*, d'une part dans l'induction de la formation du feuillet mésodermique au niveau de la ligne primitive [184, 185], et d'autre part dans l'inhibition de la différenciation cardiaque et l'expansion des progéniteurs cardiovasculaires et hématopoïétiques [35, 54, 186-192]. *Mesp1* ne serait requis que pour empêcher les progéniteurs cardiovasculaires de changer de destin vers la voie hématopoïétique lorsque la voie *Wnt* est activée, ce qui permet une expansion de ce pool de progéniteurs cardiovasculaires tôt dans le

développement [55]. Des études *in vivo* ont également confirmé que *Mesp1* et *Mesp2* sont requis de façon cellule-autonome dans l'engagement des cellules mésodermiques dans la voie cardiovasculaire [180, 181]. *Mesp1* est donc un régulateur clé de la spécification des progéniteurs cardiovasculaires en induisant l'expression de certains marqueurs cardiaques tels que *Nkx2.5*, *Islet1*, *Tbx5* et *Myocardin* [35, 193]. Une fois que les précurseurs cardiaques sont déterminés, la présence d'inhibiteurs de la voie *Wnt* est indispensable afin de promouvoir la différenciation et la maturation des cardiomyocytes [55].

Bien que quelques marqueurs génétiques aient été caractérisés, les mécanismes contrôlant les étapes de spécification et détermination des précurseurs cardiaques entre le début de la gastrulation (E6,0) et la formation du tube cardiaque primitif (E8,0) sont encore relativement méconnus. Ces étapes de spécification/détermination cellulaires sont similaires chez la souris et le poulet. Chez la souris, la spécification cardiaque débute dès E6,5 tandis que la détermination s'établit entre E7,25 et E7,5 [31, 194]. Lorsque mis en culture, les progéniteurs cardiaques nécessitent l'endoderme viscéral afin de compléter leur différenciation terminale jusqu'au jour E7,5. Après E7,5, ces structures ne sont plus requises pour leur différenciation, étant donné que des explants de mésoderme cardiaque isolés à E7,5 et mis en culture peuvent se différencier spontanément en cardiomyocytes contractiles tandis que des explants isolés à E7,25 doivent être mis en culture en présence d'endoderme viscéral pour se différencier. L'engagement à un destin de cellules myocardiques des progéniteurs cardiogéniques du CCP s'établit donc vers E7,5 [31]. Des résultats similaires ont été obtenus chez le poulet, où la spécification des progéniteurs cardiaques semble s'effectuer à partir de HH3 - HH4 (E6,5 - E6,75 chez la souris), tandis que la détermination est plus tardive entre HH6 et HH7 (E7,25 - E7,5 chez la souris) [195-198].

Hormis le mésoderme cardiogène qui est l'unique source de précurseurs cardiovasculaires des différents champs cardiaques et de l'organe pro-épicaudique (PEO), la morphogenèse du cœur nécessite également le recrutement de cellules de la crête neurale [199]. Le pool de cellules cardiaques de la crête neurale migre

au niveau du pôle artériel [176, 199-204] afin de générer les cellules musculaires lisses de l'arc aortique, du canal artériel, et des gros vaisseaux [176, 199, 201, 205-207], et contribue également à l'innervation parasympathique autonome du cœur et au développement du système de conduction cardiaque [199, 208-212]. Dans cette section seront décrits plus en détails ces pools distincts de progéniteurs cardiovasculaires qui sont spatialement et temporellement ségrégués les uns par rapport aux autres, mais dont la convergence coordonnée vers l'aire cardiaque assure la morphogenèse des différentes structures du cœur.

### **1.1.5.1 Progéniteurs du mésoderme cardiogène**

#### **1.1.5.1.1 Progéniteurs du champ cardiaque primaire (CCP)**

Tel que mentionné dans la section " 1.1.1 ", deux populations distinctes de progéniteurs cardiogéniques se discernent rapidement au cours de la gastrulation. La population cellulaire formant le CCS est localisée médialement et dorsalement au CCP qui constitue le " croissant cardiaque " [20]. Bien que l'appellation " croissant cardiaque " ne désigne que le CCP, le territoire recouvert par le CCS adopte également l'aspect d'un croissant. Les cellules du CCP se distinguent moléculairement du CCS de par l'expression de certains marqueurs. Lors de la formation du tube cardiaque primitif, *Mlc2a* et *Tbx5* ne s'expriment qu'au niveau du CCP, tandis que les cellules du CCS, qui sont initialement négatives pour ces deux marqueurs, commencent à les exprimer lorsqu'elles sont intégrées au tube cardiaque primitif. En effet, puisque le cœur tubulaire ne comprend pas tous les futurs compartiments cardiaques, les progéniteurs du CCS exprimant *Islet1* sont progressivement ajoutées aux bordures distales du tube cardiaque, au niveau des pôles artériels et veineux [20]. Étant donné la découverte relativement récente du CCS [17-19], peu de voies de signalisation ont été caractérisées afin de distinguer le CCP du CCS. Parmi ces voies de signalisation, les facteurs BMP semblent être des acteurs cruciaux de la détermination des progéniteurs du CCP étant donné que la délétion conditionnelle du récepteur *BmpR1a* dans l'ensemble des cellules *Mesp1* entraîne l'absence totale de tube cardiaque [35].

Hormis la régionalisation du tube cardiaque primordial (CCP) qui semblait se caractériser par des subdivisions relativement statiques selon les axes embryonnaires (voir section " 1.1.3.2 "), des sous-populations de progéniteurs du CCP définies par des signatures moléculaires distinctes convergent vers des structures cardiaques divergentes; c'est le cas d'une sous-population précoce de progéniteurs cardiaques *Ednra*<sup>+</sup>/*Tbx5*<sup>+</sup>/*Isl1*<sup>-</sup> du croissant cardiaque (CCP) qui se distinguent moléculairement du reste des cellules cardiaques du CCP *Ednra*<sup>-</sup>/*Tbx5*<sup>+</sup>/*Isl1*<sup>-</sup> et des progéniteurs cardiogènes *Ednra*<sup>-</sup>/*Tbx5*<sup>+</sup>/*Isl1*<sup>+</sup> du CCS. Ces progéniteurs cardiaques *Ednra*<sup>+</sup>/*Tbx5*<sup>+</sup>/*Isl1*<sup>-</sup>, localisés au niveau du pôle veineux du tube cardiaque dès E8, migrent ventralement jusqu'à la courbure externe des oreillettes et du ventricule gauche afin de contribuer à la croissance myocardique des chambres cardiaques, mais ni du canal AV ni de la courbure interne du cœur [213].

#### **1.1.5.1.2 Progéniteurs du champ cardiaque secondaire (CCS) / Progéniteurs du champ cardiaque antérieur**

La découverte relativement récente d'une seconde source de progéniteurs cardiaques assurant l'expansion et la croissance du tronc artériel [17-19] a permis de confirmer les quelques rares études réalisées dans les années 70 qui relataient d'un recrutement de précurseurs cardiaques au niveau du pôle artériel chez le poulet [14, 84, 86] et la souris [85]. Des études subséquentes ont démontré que le CCS contribuait également à la formation du ventricule droit [16, 87] et aux structures adjacentes au pôle veineux, telles que le sinus veineux et une portion importante des oreillettes [20]. Au stade du " croissant cardiaque " vers E7,5, le CCS est localisé médialement et dorsalement au CCP. Suite à l'initiation de la formation du tube cardiaque vers E7,75, les progéniteurs du CCS localisés dans la région dorsale et antérieure par rapport au tube cardiaque migrent au niveau du pôle artériel afin de former le ventricule droit et le tronc artériel [16], tandis que la région dorsale et postérieure du CCS, relativement au tube cardiaque, fournit les progéniteurs qui intégreront le sinus veineux et les oreillettes [20]. Les progéniteurs du CCS migrent également via le mésocardium dorsal jusqu'à ce que cette structure soit éliminée plus tard durant le développement. La majorité des

progéniteurs du CCS incorporent le tube cardiaque entre E8.5 et E10.5 [18, 49]. L'addition progressive des structures cardiaques aux pôles artériel (ventricule droit + tronc artériel) et veineux (sinus veineux + une portion importante des oreillettes) du tube cardiaque par le recrutement de progéniteurs du CCS, ainsi que le chevauchement significatif des cellules dérivées des deux champs cardiogènes dans les 4 chambres cardiaques [1, 97], infirment donc le modèle du tube cardiaque pré-segmenté en faveur du modèle de " ballooning ". En effet, le modèle de pré-segmentation du tube cardiaque linéaire impliquerait une ségrégation clonale stricte entre les régions adjacentes le long de l'axe artério-veineux, ce qui est contredit par l'hétérogénéité clonale observée au niveau des différentes structures cardiaques. Tel que mentionné dans la section " 1.1.3.2 ", le concept de " ballooning " est caractérisé par une régionalisation spatiale incomplète du tube cardiaque linéaire suivie du ballonnement des différentes chambres myocardiques au niveau des diverses régions du cœur tubulaire primitif via le recrutement de diverses sous-populations de progéniteurs cardiaques provenant du CCS. Ainsi, le ballonnement des chambres auriculaires a lieu au niveau de la région caudo-latéro-dorsale, tandis que le ventricule gauche se développe dans la région ventrale du tube cardiaque; le bombement du ventricule droit s'effectue au niveau du pôle artériel par incorporation progressive de progéniteurs du CCS au niveau de la région antéro-ventrale au tube cardiaque [78, 88] (voir Fig. 1.2 et Fig. 1.2).

Hormis le " patterning " antéropostérieur, dorso-ventral et la latéralisation gauche-droite du tube cardiaque linéaire (CCP) qui sont indispensables au ballonnement des différents compartiments myocardiques le long de l'ébauche du cœur tubulaire primitif [78, 88], la spécification médio-dorsale du CCS diffère de la spécification latéro-ventrale du CCP afin que ces deux champs morphogénétiques soient ségrégés. La spécification des champs cardiogènes résulte probablement de l'intégration spatio-temporelle de différents gradients de morphogènes auxquels ils sont soumis lors de la migration des progéniteurs cardiaques qui les composent. Parmi les voies de signalisation agissant durant la spécification cardiaque, la voie Wnt est indispensable à l'auto-renouvellement et l'expansion des progéniteurs cardiogéniques au niveau du CCS en inhibant leur différenciation [35, 54]. L'expression de la  *$\beta$ -caténine* par les progéniteurs mésodermiques cardiogéniques

du CCS joue un rôle essentiel dans leur expansion, étant donné que la délétion de la *β-caténine* au niveau des cellules *Mesp1* n'affecte aucunement l'expression des marqueurs du CCP et la formation du tube cardiaque, mais empêche l'inflexion du cœur et réduit l'expression de gènes spécifiques du CCS [35].

Quelques autres gènes tels que *Fgf8* [48, 214-216], *Fgf10* [216], *Foxh1* [217], *Hand2* [123, 218, 219], *Islet1* [20], *Mef2c* [220, 221], *Tbx1* [214, 215, 222-229], et *Tbx20* [230-233] sont essentiels à la spécification, l'expansion, la migration, et la survie des progéniteurs du CCS. À l'exception de *Fgf10*, l'ablation de chacun de ces gènes chez la souris entraîne une hypoplasie du tronc artériel qui s'étend parfois jusqu'au ventricule droit. Parmi ces marqueurs du CCS, *Islet1* est crucial à la morphogenèse du ventricule droit, du tronc artériel, et des structures auriculaires, confirmant ainsi que le CCS contribue à la fois au pôle artériel et au pôle veineux durant la cardiogénèse [20]. Bien que l'ablation d'*Islet1* affecte la migration, la prolifération, et la survie des progéniteurs du CCS [20], la spécification des progéniteurs semble également altérée puisque l'expression de *Nkx2.5* dans le CCS et les structures qui en dérivent nécessite l'activation coopérative d'un de ses enhancers via *Islet1*, *Gata4*, et probablement *Tbx20* [230].

Chez le poulet, contrairement à la souris, tous les progéniteurs au sein des champs cardiaques bilatéraux expriment *Islet1* [234], ce qui semblait suggérer que le poulet ne possédait qu'un seul champ cardiaque bilatéral [15]. Toutefois, similairement à la souris, une seconde source de progéniteurs cardiaques, localisée dans la région correspondant au CCS, fournit les cellules nécessaires à l'expansion et à la croissance du tronc artériel [17, 19] et du ventricule droit chez le poulet [235]. Bien que des progéniteurs soient recrutés depuis le dit CCS, certains auteurs suggèrent que le CCS ne représenterait qu'un sous-domaine distinct d'un unique champ cardiaque primordial. Selon ce modèle, au lieu de multiple champs cardiaques, un unique champ cardiaque primordial composé d'une population homogène de précurseurs cardiaques subirait un " patterning " complexe entraînant une variété de subdivisions, qui se caractérisent les unes des autres par des signatures moléculaires divergentes [236, 237]. Un résultat en faveur de ce modèle est le chevauchement significatif des cellules dérivées des deux champs

cardiogènes dans les 4 chambres cardiaques et le canal AV, ce qui se traduit par une absence absolue de restriction clonale au niveau des compartiments myocardiques [20, 97, 238], bien que les progéniteurs du CCP soient essentiellement intégrés dans le ventricule gauche, tandis que ceux du CCS sont surtout incorporés dans le ventricule droit et les deux oreillettes; seul le tronc artériel dérive exclusivement des progéniteurs cardiaques du CCS [20, 97]. En outre, des analyses clonales rétrospectives de cellules myocardiques grâce à une souris  $\alpha$ -actine cardiaque *nlaacZ*, ainsi que des études de filiation cellulaire, semblent suggérer que tous les précurseurs cardiaques du CCP et du CCS dérivent d'un seul et même progéniteur cardiovasculaire pluripotent [97], qui exprimerait *Mesp1* [179-181], *Mesp2* [181], *Flk1* [182, 183, 239], et probablement *Islet1* [238, 240] (voir section " 1.1.5 "). Ainsi, ces résultats supportent le modèle dans lequel le tube cardiaque constitué de cardiomyocytes différenciés recruterait continuellement, via les pôles afférent et efférent, des progéniteurs cardiogéniques provenant d'un sous-domaine dorso-médial d'un unique champ cardiaque primordial. La seule différence entre ce modèle et celui dans lequel deux champs cardiogènes existent se situerait donc dans la définition d'un champ cardiaque : soit (1) l'ensemble du mésoderme cardiogène spatialement délimité constituerait un champ cardiaque primordial unique subdivisé en sous-domaines suite à un " patterning " complexe, soit (2) chaque sous-domaine du mésoderme cardiogène caractérisé par une signature moléculaire unique délimiterait un champ cardiaque distinct, ce qui aurait pour conséquence de subdiviser le mésoderme cardiogène en plusieurs champs morphogénétiques cardiogéniques, chacun susceptibles de former certaines structures cardiaques. Toutefois, ce dernier modèle risque de ne refléter que le " patterning " complexe du mésoderme cardiogène au cours de la cardiogénèse, et semble négliger le fait que des cellules cardiaques dérivées des deux champs cardiogènes (CCP et CCS) incorporent des compartiments myocardiques communs, bien que leur proportion varie selon la structure cardiaque en question.

Quelque soit le modèle retenu, les différents gradients de morphogènes que traversent les précurseurs cardiogènes au cours de leur migration vers l'aire cardiaque contribuerait à leur diversification. Cette diversification des progéniteurs



cardiogènes reflèterait la restriction progressive du potentiel développemental de chaque population de progéniteurs générée au sein du ou des champ(s) cardiogène(s). Ce processus de diversification pourrait s'initier selon l'axe antéro-postérieur simultanément ou séquentiellement au " patterning " médio-latéral et dorso-ventral qui entraîne la création des territoires du mésoderme splanchnique correspondant au CCP et au CCS. Le " patterning " de chacun de ces deux champs cardiogènes contribuerait à la création de divers sous-domaines regroupant une ou plusieurs de sous-populations cellulaires. D'après le modèle actuel, le CCS regroupe des progéniteurs cardiaques qui se différencient plus tardivement que les progéniteurs du CCP, et par conséquent serait soumis à un " patterning " distinct de celui des progéniteurs cardiaques du CCP. Une étude récente a effectivement mis en évidence que le CCS subissait un " patterning " antéro-postérieur sous l'influence de l'acide rétinoïque, ce qui résultait en la formation de sous-domaines caractérisés par des profils d'expression combinatoires distincts de gènes *Hox*. Chacun de ces sous-domaines, reflétant la ségrégation d'une sous-population distincte de progéniteurs cardiaques du CCS, génère des structures différentes le long du tronc artériel, suggérant donc que le " patterning " antéro-postérieur du CCS se traduit en un " patterning " proximo-distal au niveau du tronc artériel [241], selon un mode topographique inversé [242]. Des analyses clonales rétrospectives supportent également l'existence de diverses sous-populations au sein du CCS pré-destinées à intégrer certaines structures cardiaques au niveau du tronc artériel [169, 243, 244]. Bien que chaque structure cardiaque regroupe majoritairement des cellules dérivées d'une sous-population clonale unique du CCS, elles ne sont pas strictement définies par cette sous-population puisque de nombreuses cellules dérivant de sous-populations adjacentes s'entremêlent avec la sous-population principale préférentielle. Le chevauchement de cellules dérivées de sous-populations distinctes de progéniteurs cardiogènes dans chaque structure cardiaque semble suggérer que les progéniteurs de chacune des sous-populations du CCS conservent une certaine plasticité cellulaire.

#### **1.1.5.2 Progéniteurs pro-épicardiques**

L'organe pro-épicaudique (PEO) (ou séreuse pro-épicaudique) est une ébauche extracardiaue primitive qui débute son développement à E9,0 au niveau du septum transversum (mésoderme hépatogénique), à proximité du bourgeon hépatique dans la région du sinus veineux, et qui atteint sa taille maximale à E9,5. Par la suite, les cellules épicaudiques, qui proviennent du PEO, se disséminent et forment sur le pourtour du cœur une enveloppe cellulaire, nommé épicaud, qui recouvre à terme l'ensemble du cœur (vers E12). Dès E9,5, les cellules épicaudiques subissent une TEM, transitent par l'espace subépicaudique et pénètrent dans le myocarde pour se différencier en diverses populations cardiaues, tels que les fibroblastes cardiaues ainsi que les progéniteurs vasculaires coronariens endothéliaux et musculaires lisses [245-250]. Une très faible proportion de cellules dérivées de l'épicaud incorpore également les valves du canal AV [177, 246, 251, 252], bien que la fonction de ces quelques cellules éparpillées au sein des valves auriculo-ventriculaires soit encore inconnue. Récemment, il a été également confirmé que les cellules épicaudiques contribuent substantiellement aux cellules musculaires lisses coronariennes et aux péricytes, à une forte proportion de fibroblastes cardiaues et de cardiomyocytes des oreillettes et du septum inter-ventriculaire, ainsi qu'à une minorité de cellules endothéliales [245, 253]. Des analyses clonales ont également mis en évidence que certains de ces progéniteurs épicaudiques sont pluripotents, car des cellules uniques peuvent donner naissance, après expansion *in vitro*, aux diverses populations cardiaues dérivant naturellement de ces progéniteurs *in vivo* [245]. Toutefois, il semble qu'*in vivo*, les premiers progéniteurs épicaudiques pénétrant dans le cœur à E9,75 génèrent des cardiomyocytes, tandis que les cellules musculaires lisses, péricytes et fibroblastes dérivant de ces progéniteurs épicaudiques n'apparaissent dans le cœur qu'approximativement à E12,5 [245]. Finalement, l'utilisation des lignées de souris *Nkx2.5-Cre* et *Islet1-Cre* ont permis de suggérer que les cellules du PEO (*Wt1*<sup>+</sup>) dérivent des progéniteurs cardiaues exprimant *Nkx2.5* et/ou *Islet1* [253, 254].

Le système coronarien se développe également par vasculogénèse depuis l'épicaud. En effet, au niveau de l'espace subépicaudique, les cellules mésenchymateuses provenant d'une TEM se différencient en hémangioblastes

vers E9,5, puis en angioblastes et érythrocytes [255, 256]. Les angioblastes se réunissent en îlots sanguins essentiellement au niveau de la constriction auriculo-ventriculaire et du sillon inter-ventriculaire, puis délimitent des vésicules vasculaires primitives (futurs lumières des vaisseaux) contenant des érythrocytes [257-260]. Ces vésicules fusionnent pour former des capillaires sanguins (processus de capillogenèse) qui s'organisent en un plexus vasculaire subépicaire et intra-myocardiaire. Ce plexus vasculaire est ensuite réorganisé par le processus d'angiogenèse, durant lequel les capillaires subissent des bourgeonnements, des connexions, et des intussusceptions afin de générer le réseau d'artères et de capillaires du système coronarien. Entre E14 - E15,5, l'ensemble de ces artères et capillaires coronariens subépicaire et intra-myocardiaire établissent une connexion avec l'aorte [261-265]. Lorsque le sang commence à circuler dans le système coronarien, les cellules musculaires lisses continuent à être recrutées et à se différencier afin de fournir un support structural et une stabilité aux parois vasculaires [266, 267]. Le système coronarien continue à se développer après la naissance par angiogenèse et non plus par vasculogenèse comme cela était le cas durant l'embryogenèse [268]. L'épicaire est donc également à l'origine des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des fibroblastes intervenant dans l'organisation du système coronarien.

#### **1.1.5.3 Cellules cardiogènes de la crête neurale**

Les cellules cardiogènes de la crête neurale (CNCCs) représente une sous-population *Pax3*<sup>+</sup> de progéniteurs de la crête neurale crâniale qui, suite à une TEM, délamine de la région dorsale du tube neural entre la moitié inférieure de la placode optique et la bordure caudale du troisième somite entre HH9 et HH13<sup>-</sup>, puis émigre et colonise préférentiellement les arcs pharyngés 3, 4, et 6 dès HH14 [200, 201, 269]. Certaines cellules ectomésencymateuses de ce pool de CNCCs continuent de migrer ventralement le long des arcs aortiques 3, 4, et 6 jusqu'au pôle artériel du cœur dès HH22 (plus précocement chez la souris, dès E9,75) [176, 200-204] afin d'infiltrer et de constituer une portion substantielle du mésenchyme des bourrelets endocardiques du tronc artériel, nécessaire à sa septation subséquente [176, 206, 270-273]. En effet, chez le poulet, l'ablation des CNCCs

au niveau des somites 1 à 3 [199] ou au niveau des arcs aortiques 3, 4, et 6 [274] entraîne des malformations du septum aortico-pulmonaire (PTA, DORV, et TGA) dont la sévérité dépend du nombre de CNCCs éliminé [275, 276]. Bien que la septation du cône artériel et la formation des valves de l'aorte et de l'artère pulmonaire nécessitent la présence substantielle des CNCCs [272, 277], leur contribution directe dans ces structures n'est que très limitée, voire inexistante, plus tard dans la vie fœtale ou adulte. En fait, la sous-population de CNCCs qui incorporent les bourrelets endocardiques auriculo-ventriculaires et conotroncaux (bourrelets endocardiques du cône artériel, voir section " 1.1.4.4 ") subissent le processus d'apoptose suite à l'achèvement de la formation du septum auriculo-ventriculaire, du septum conotroncale, des valves auriculo-ventriculaires, et des valves semi-lunaires [211, 273]. Toutefois, contrairement à la majorité des analyses de filiation cellulaire des CNCCs [176, 177, 211, 273], une étude relate la persistance d'un nombre substantiel de cellules dérivées des CNCCs au niveau des valves semi-lunaires matures et du feuillet septal des valves AV matures chez l'adulte [165], ce qui expliquerait la présence de mélanocytes au niveau de ces valves dans le cœur adulte [278]. À ce jour, la persistance des cellules dérivées des CNCCs au niveau de valves matures demeure donc controversée.

Une deuxième sous-population de CNCCs pénètre dans le cœur à la fois au niveau du pôle artériel (dès HH22) et du pôle veineux (dès HH30) afin de contribuer indirectement à la formation de l'innervation parasympathique du cœur [199, 202, 208-211, 279, 280] et du tissu connectif isolant le système de conduction His-Purkinje (faisceau de His + branches droite et gauche du faisceau de His + réseau de fibres de Purkinje) [212]. En effet, cette sous-population de CNCCs semblent requises afin de sécréter des facteurs instructifs nécessaires à l'induction de la différenciation des cardiomyocytes en cellules du système de conduction cardiaque central (nœud sinusal, nœud auriculo-ventriculaire) et périphérique (cellules de Purkinje ou fibres de Purkinje), ainsi que dans la compaction lamellaire et la séparation du faisceau de His du myocarde limitrophe, avant d'entrer en apoptose [211, 212, 281, 282]. À l'opposé de ces deux sous-populations de CNCCs dite " pro-apoptotiques ", la majorité des autres CNCCs

gènèrent essentiellement les cellules musculaires lisses de l'arc aortique, du canal artériel, et des gros vaisseaux [176, 199, 201, 205-207].

Hormis leurs rôles directes dans la septation du tronc artériel, les CNCCs secondent également la migration et la distribution normales des progéniteurs du CCS au niveau du pôle artériel du cœur [282-287], et semble également posséder une fonction anti-proliférative sur ces mêmes progéniteurs du CCS [288, 289]. Les malformations du tronc artériel émanant de l'ablation des CNCCs ou d'une mutation génique affectant les fonctions normales des CNCCs semblent donc exacerbées par l'altération de la prolifération et la migration/distribution des progéniteurs du CCS au niveau du tronc artériel. En revanche, l'ablation des CNCCs interfère également dès HH14 l'élongation et l'inflexion sigmoïde du tube cardiaque, normalement assurées par la migration des progéniteurs du CCS au niveau du pôle artériel du cœur. Les interactions entre les CNCCs et les progéniteurs du CCS au niveau des arcs pharyngés semblent donc indispensables au " patterning " du mésoderme pharyngé et à la migration des progéniteurs du CCS [284, 285, 287], étant donné que les altérations du " looping " cardiaque s'amorcent bien avant (dès HH14) que les CNCCs intègrent le cœur vers HH22 [288].

### **1.1.6 Signalisation endothélio-myocardique**

#### **1.1.6.1 Endocarde**

Plusieurs études suggèrent que les cellules pré-myocardiques et pré-endocardiques sont issues d'une seule et même population de précurseurs qui se sépare en deux au cours des stades HH5-7 [74, 290, 291]. La population initialement homogène de progéniteurs cardiaques se diversifierait selon un gradient caudo-rostral durant leur migration au niveau du mésoderme latéral. Entre les stades HH5-6 (E7 chez la souris), les premières cellules positives pour QH-1 (anticorps monoclonal reconnaissant un marqueur des cellules endothéliales et hématopoïétiques chez la caille [292]) apparaissent dans le mésoderme latéral [290, 293]. Entre les stades HH7-8 (2 paires de somites), ces cellules positives

pour QH-1 émergent dans la portion postérieure du champ cardiaque en migration [74]. Toutes ces cellules mésenchymateuses pré-endocardiques délaminent du mésoderme splanchnique pré-cardiaque au niveau de l'interface endoderme-mésoderme [10, 12, 294]. Elles reposent ensuite dorsalement à la membrane basale de l'endoderme qui est constituée d'une matrice extracellulaire filamenteuse riche en fibronectine, cytotactine, collagène I et IV, laminine, fibuline, fibrilline et l'antigène JB3 associée à la fibrilline-2 [74, 293, 295-297]. Les précurseurs cardiaques forment donc deux populations cellulaires qui se séparent en deux feuillets, l'un composé de cellules mésodermiques cubiques (pro-myocarde) et l'autre, sous-jacent, constitué de cellules endothéliales fusiformes (pro-endocarde) [10, 12, 294].

Suivant la ségrégation des cellules pré-endocardiques et pré-myocardiques, les précurseurs endothéliaux cardiogéniques (pré-endocardiques) et extracardiaques forment des contacts les uns avec les autres afin d'ultimement constituer un réseau vasculaire primitif. Au stade HH7<sup>+</sup> (2 paires de somites), les cellules pré-endocardiques sont amassées dans la paire de primordia cardiaques, avec toutefois davantage de cellules dans le champ cardiaque droit que celui de gauche. Quelques cellules endothéliales (positives pour QH-1) se distinguent au niveau du mésoderme paraxial et à l'extérieur des champs cardiaques bilatéraux établissant des connections entre le pro-endocarde et les aortes dorsales en formation. À partir de HH8 (4 paires de somites), les cellules endothéliales dans les champs cardiaques établissent davantage de connections avec les cellules endothéliales extra-cardiaques [74]. Les cellules endothéliales se retrouvent en bordure antérieure de la fosse cardiaque (Fovea cardiaca) au niveau de l'axe ventral de l'embryon. Des précurseurs endothéliaux convergent pour former un plexus vasculaire qui recouvre l'intestin antérieur. C'est également à ce stade que la gelée cardiaque commence à s'accumuler dans l'interstice entre le pro-myocarde et le pro-endocarde [12, 294]. Au stade HH8<sup>+</sup> (5 à 6 paires de somites), deux bandes distinctes de cellules endothéliales s'étendent rostralement pour former les futures aortes ventrales. Postérieurement aux champs cardiaques bilatéraux, les cellules endothéliales établissent des connections avec les veines vitellines. Dorsalement, des bandes de cellules endothéliales, correspondant aux

aortes dorsales présomptives, fusionnent avec les aortes ventrales en développement afin d'ériger la première paire d'arcs aortiques. Lors de la fusion de la paire de primordia cardiaques, les plexus de cellules pré-endocardiques forme un canal (ou tube) correspondant à l'endocarde définitif du cœur tubulaire primitif. Ce tube endocardique forme ainsi un intermédiaire entre les veines vitellines et les aortes ventrales, elles mêmes associées aux aortes dorsales par les arcs aortiques branchiaux, assurant ultimement l'établissement du système cardio-vasculaire primitif [12, 74, 298].

Bien que cellules pré-endocardiques et pré-myocardiques ne soient morphologiquement et moléculairement distinctes qu'après la gastrulation, des études de filiation cellulaire semblaient indiquer que leur spécification précédait la gastrulation, au stade blastula. Des analyses clonales rétrospectives mettaient en évidence que des clones uniques, infectés par un rétrovirus non-répliatif exprimant la  *$\beta$ -galactosidase*, et implantés au niveau de la région rostrale de la ligne primitive (HH3), du mésoderme pré-cardiaque, ou du tube cardiaque ne génèrent qu'un seul type de population cellulaire, myocardique ou endocardique [247, 299, 300]. La ségrégation précoce des destins des lignées pré-myocardiques et pré-endocardiques n'est toutefois pas confirmée par la cartographie des cellules issues des cellules mésodermiques *MesP1-Cre* qui expriment *MesP1* seulement dans les premiers stades de la formation de la ligne primitive; les cellules descendantes de ces cellules mésodermiques *MesP1*-positives évoluent en cardiomyocytes et en cellules endocardiques dans le cœur embryonnaire [180]. Les cellules épiblastiques, qui vont former le mésoderme cardiaque, ne sont pas aiguillées vers un destin myocardique ou endocardique avant leur ingression au niveau de la ligne primitive. Par conséquent, il existerait un précurseur commun tripotent qui générerait les cellules myocardiques, endocardiques et vasculaires [180].

Hormis l'origine encore obscure des cellules endothéliales cardiaques, quelques études ont mis en évidence qu'il existe une hétérogénéité parmi les cellules endocardiques qui tapissent les parois internes du cœur. Une sous-population de ces cellules endothéliales, notamment celles qui recouvrent les

bourrelets endocardiques du canal AV et du tronc artériel, sont hétérogènes quant à leur expression de l'antigène JB3, tandis que les cellules endocardiques ventriculaires sont majoritairement JB3<sup>-</sup>. De surcroît, contrairement aux cellules endocardiques JB3<sup>-</sup>, les cellules JB3<sup>+</sup> du canal AV et du tronc artériel possèdent le potentiel de se transformer en cellules mésenchymateuses [296, 301]. Outre les cellules endocardiques qui tapissent les parois internes des cavités cardiaques, d'autres cellules endothéliales sont localisées dans le cœur. Il existe d'une part les cellules endothéliales des capillaires myocardiques et de l'endocarde, et d'autre part les cellules endothéliales des artères et veines coronariennes intra-myocardiques et éplicardiques qui dérivent de précurseurs pro-éplicardiques [302].

### 1.1.6.2 Myocarde

Tel qu'indiqué dans la section " 1.1.5.1 ", la population initialement homogène de progéniteurs cardiaques se diversifie et se sépare en cellules pré-endocardiques et pré-myocardiques durant leur migration au niveau du mésoderme latéral. Entre les stades HH6-7, les premières déhiscences, nommées vésicules coelomiques péricardiques ou vésicules amnio-cardiaques, émergent au sein du feuillet mésodermique et fusionnent les unes aux autres pour former dans la région céphalique la cavité coelomique péricardique, qui sépare le mésoderme splanchnique (ventral) du mésoderme somatique (dorsal) [10, 12, 294]. La *N-cadhérine/β-caténine* semble impliquer dans cette démarcation qui mène à la séparation de ces deux feuillets mésodermiques et, par conséquent, au compartimentage des cellules pré-cardiaques dans le feuillet splanchnique [10, 11]. Durant le tri cellulaire de ces deux populations de cellules pré-cardiaques et la formation de la cavité coelomique dans le sens rostro-caudal, les cellules pré-myocardiques acquièrent une polarité qui s'observe à partir du stade HH8. À ce stade elles expriment 1) la N-cadhérine sur leur paroi cellulaire apicale, en bordure de la cavité coelomique; 2) la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase sur leur membrane cytoplasmique baso-latéral; 3) la sous-unité β1 de l'intégrine sur leur surface basale avoisinant le feuillet de cellules pré-endocardiques et la membrane basale de l'endoderme. Les cellules mésenchymateuses pré-myocardiques cuboïdes forment finalement un épithélium qui se démarque morphologiquement et moléculairement des cellules



pré-endocardiques [10, 11, 303-305]. Cette communauté de précurseurs cardiaques subit ensuite d'autres modifications phénotypiques tels que la myofibrillogenèse [306-308] et l'initiation de l'activité électrique [309-311].

Aux premiers stades de la formation du cœur tubulaire primitif (E8,25 chez la souris; HH9 chez le poulet), les deux feuillets (1 couche cellulaire / 1 feuillet) de cellules pré-myocardiques (interne et externe) de structures polygonales [303] possèdent des réseaux réticulés de fibres d'actine [312]. Par la suite, des différences d'alignement et de distribution des myofibres apparaissent entre le feuillet myocardique interne (en contact avec la gelée cardiaque) et externe (adjacent à la cavité coelomique péricardique). Dans le feuillet myocardique externe, les myofibres se connectent les uns aux autres au niveau des jonctions inter-cellulaires et établissent des réseaux lâches. Dans la portion basale du feuillet myocardique interne, les myofibres commencent à s'aligner de manière circonférentielle (c.à.d. perpendiculaire à l'axe longitudinal du tube cardiaque), probablement afin de maintenir la structure tubulaire du cœur. Dès l'initiation du " looping " cardiaque (E8,5 chez la souris; HH10 chez le poulet), le feuillet externe de cellules myocardiques polygonales possède une cytoarchitecture striée émanant des réseaux réticulés denses de myofibres matures, tandis que le feuillet interne de cellules myocardiques fusiformes dispose d'un réseau de myofibres matures alignées parallèlement à l'axe longitudinal de ces cellules, et de manière circonférentielle au tube cardiaque. Au cours du " looping " cardiaque, ces réseaux de myofibres s'accroissent en taille tout en conservant leur structure [306, 312, 313].

L'apparition de cette myofibrillogenèse coïncide également avec l'initiation de l'activité électrique. Chez les mammifères tels que la souris, des fluctuations d'activité électrique précèdent légèrement les contractions spontanées de petits groupes de cellules dans les deux primordia cardiaques bilatéraux à E8 (3 - 4 paires de somites), juste avant leur fusion pour former le tube cardiaque [310, 311, 314]. Ces contractions faibles et irrégulières sont rapidement suivies par des contractions coordonnées générant des ondes péristaltiques au-delà du stade de 4 paires de somites [311]. C'est également à partir de ce stade que les premiers

érythrocytes pénètrent dans l'embryon [315]. La circulation sanguine unidirectionnelle s'établit à E9,25 lorsque les coussins endocardiques du canal atrio-ventriculaire se forment [311]. À peu près à ce même stade les contractions péristaltiques sont remplacées par des contractions synchronisées dans le ventricule primitif, ceci étant corrélé avec l'émergence du système de conduction à E9,5 [311, 316-318].

### **1.1.6.3 Interaction moléculaire endocarde-myocarde**

Le cœur est composé d'une multitude de lignées cellulaires qui interagissent les unes avec les autres afin d'assurer le développement et la fonction de cet organe. Les interactions entre les cellules endothéliales et les cardiomyocytes sont requises lors de la cardiogénèse mais également pour maintenir la fonction du cœur adulte. En effet, de nombreux facteurs auto- et paracrines influencent directement la croissance, le métabolisme, la contractilité et la rythmicité cardiaque chez l'adulte.

#### **1.1.6.3.1 Interaction endocarde-myocarde durant la cardiogénèse**

De multiples études ont prouvé que l'interdépendance existant entre les cellules endothéliales et les cardiomyocytes est indispensable au développement normal du cœur. Il faut toutefois distinguer la différence entre d'une part les cellules endothéliales des artères et veines coronariennes intra-myocardiques et subépicaudiques qui contrôlent la fonction coronarienne mais qui ne sont pas en contact direct avec le myocarde, et d'autre part les cellules endothéliales des capillaires myocardiques et de l'endocarde qui sont à proximité des cardiomyocytes autorisant des interactions intercellulaires considérables et indispensables au développement du myocarde [302]. Les interactions entre le myocarde et les cellules endothéliales de l'endocarde et des capillaires myocardiques sont assurées par des facteurs auto- et paracrines. Ces signaux réciproques entre myocarde et endocarde participent à trois étapes essentielles de la maturation cardiaque qui correspondent 1) à la trabéculatation des quatre compartiments cardiaques, 2) à la formation des bourrelets endocardiques suivie

du développement des valves et des cloisons cardiaques, et 3) à la croissance et l'épaississement du myocarde compact des chambres ventriculaires en parallèle au développement du système coronarien [302].

#### 1.1.6.3.1.1 Développement des bourrelets endocardiques

Peu de temps après l'initiation de la formation des bourrelets endocardiques qui se caractérise par une accumulation de gelée cardiaque acellulaire entre l'endocarde et le myocarde au niveau du constriction auriculo-ventriculaire (E9,0), les cellules endocardiques subissent une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) à partir de E9,5. Bien que la gelée cardiaque s'accumule dès E9,0 au niveau du tronc aortico-pulmonaire, la TEM ne débute qu'à E10,5 [319]. Seules les cellules endothéliales tapissant la paroi interne du canal AV et de la région proximale du tronc artériel possède la capacité de subir une TEM sous l'influence de signaux provenant de la région myocardique adjacente [320-323]. De surcroît, seule une sous-population restreinte de cellules endothéliales du canal AV et du tronc artériel possèdent la propriété intrinsèque (compétence) de se transformer en cellules mésenchymateuses [324-328], tandis qu'aucune des cellules endothéliales des oreillettes et ventricules ne subissent cette TEM, même lorsqu'elles sont mises en présence *in vitro* avec les régions myocardiques du canal AV [327, 328]. Ces études suggèrent donc qu'il existe une hétérogénéité de cellules endothéliales, ce qui a été partiellement confirmé par la découverte du marqueur JB3 qui n'est exprimé que dans une sous-population de cellules endocardiques au niveau du canal AV et de la région proximale du tronc artériel. Durant le processus de TEM, les cellules endothéliales JB3<sup>+</sup> se transforment donc en cellules mésenchymateuses JB3<sup>+</sup> qui envahissent peu à peu la gelée cardiaque des bourrelets endocardiques, ces derniers étant essentiels à la formation des futurs tissus fibreux des valves et des cloisons cardiaques [296, 301].

Des études sur les souris déficientes pour *Notch1* ou *RBPj $\kappa$*  ont mis en évidence que la voie de signalisation *Notch* est indispensable à la TEM des bourrelets endocardiques du canal AV et du tronc artériel. Réciproquement, la surexpression chez le *zébrafish* du domaine intracellulaire actif de NOTCH

entraîne une hyperplasie des valves cardiaques [329]. Chez l'humain, des mutations de *NOTCH1* sont associées à des affections des valves aortiques et mitrales [330]. Les patients porteurs de mutations du ligand NOTCH, *Jagged1*, développent le syndrome d'Alagille qui regroupe un ensemble de malformations dont des défauts au niveau des bourrelets endocardiques [331-333]. De même, la délétion simple d'un gène cible effecteur de la voie *Notch*, tel que *Hey2*, ou les délétions combinées de *Hey1* et *Hey2*, ou *Hey1* et *Hey3*, résultent en des MCCs incluant des défauts au niveau des bourrelets endocardiques [334-336]. Une étude réalisée chez la souris a également mis en évidence que l'importance de la voie de signalisation *Notch* réside dans son rôle d'initiation de la TEM des cellules endothéliales des bourrelets endocardiques, en stimulant l'expression de *Slug* vers E9,5. En accord avec ce résultat, les souris *Slug*<sup>-/-</sup> exhibent une altération de la TEM vers E9,5 qui est toutefois contrebalancée par une hausse d'expression de *Snail* vers E10,5. Par contre, l'abolition concomitante de *Slug* et *Snail* entraîne des défauts sévères de la TEM qui persistent après E10,5. La voie Notch agit également en concert avec TGFβ2 afin d'induire de façon synergique l'expression de *Snail* vers E10,5 et ainsi de renforcer le processus de TEM au niveau des bourrelets endocardiques [337].

Tel que mentionné précédemment, la famille *Tgfβ* participe au développement des bourrelets endocardiques [319, 338]. Les souris déficientes pour *Tgfβ2* exhibent des malformations au niveau des structures dérivant des bourrelets endocardiques du canal AV et du tronc artériel, telles que des DORV, des défauts de différenciation et de maturation des valves (conservation du phénotype mésenchymateux des bourrelets) ainsi que des défauts de septation ventriculaire conséquence de l'hypocellularité des bourrelets endocardiques [339, 340]. Chez la souris, *Tgfβ2*, dont l'expression est détectée dans le myocarde auriculo- et bulbo-ventriculaire dès E9,0, semble donc être le ligand régulant principalement la TEM [319, 341], puisque les souris *Tgfβ1*<sup>-/-</sup> exhibent des phénotypes moins sévères au niveau des structures dérivant des bourrelets endocardiques [342, 343], tandis que les souris *Tgfβ3*<sup>-/-</sup> ne présentent aucun phénotype cardiaque [344, 345]. Bien que les souris déficientes pour *Tgfβ1* et *Tgfβ3* exhibent respectivement peu ou aucun défauts majeurs des bourrelets endocardiques, des études sur des explants

cardiaques et le profil d'expression spatio-temporel de TGF $\beta$ 3 suggèrent au contraire que ce ligand participe à la TEM quoiqu'à un stade plus tardif que TGF $\beta$ 2 [319]. La répression concomitante de l'activité de TGF $\beta$ 1 et TGF $\beta$ 3 par des anticorps spécifiques, au niveau d'explants auriculo-ventriculaire, entraîne une inhibition significative de la TEM, ce qui renforce l'hypothèse que ces deux ligands régulent de façon synergique la TEM des bourrelets endocardiques [346]. TGF $\beta$ 1 pourrait par contre agir en concert avec TGF $\beta$ 2 dans les stades précoces de la TEM, étant donné que l'expression de TGF $\beta$ 1 au niveau de la gelée cardiaque des bourrelets endocardiques coïncide avec le début de ce processus vers E9,5 [346]. La délétion conditionnelle du récepteur *Tbr1* (*Tgfb2*) au niveau des cellules endothéliales n'inhibe pas le processus de TEM mais entraîne toutefois des malformations du canal AV, ce qui suggère que le récepteur TBR1 (*Tgfb2*) participe davantage à la prolifération et la différenciation des cellules mésenchymateuses ainsi que la maturation des bourrelets endocardiques, plutôt qu'à l'initiation du processus de TEM [347]. Les souris déficientes pour le récepteur TGF $\beta$  de type III (TBR3, betaglycan), qui est normalement exprimé au niveau des cellules endothéliales des bourrelets endocardiques du canal AV et du tronc artériel, présentent des défauts de septation ventriculaire au niveau du septum intermédiaire, confirmant ainsi le rôle de TBR3 dans la prolifération ou la maturation des cellules mésenchymateuses [348]. Au contraire, le récepteur de type III (endoglin) semble contrôler la phase précoce de la TEM étant donné que les embryons endoglin<sup>-/-</sup> exhibent à leur mort (entre E10 et E10,5) des bourrelets endocardiques acellulaires (aucune cellule mésenchymateuse) [349]. Il est toutefois difficile de concilier ce phénotype avec le fait qu'aucune des souris déficientes pour l'un des trois ligands TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 et TGF $\beta$ 3) ne présente une inhibition complète de la TEM. Une explication plausible serait que ces ligands possèdent des fonctions redondantes leur permettant de se compenser mutuellement lors de l'activation de la TEM.

#### **1.1.6.3.1.2 Trabéculatation des compartiments ventriculaires**

À E10, la paroi interne des futurs compartiments cardiaques est marquée par l'apparition de saillies du myocarde, les trabécules, au niveau de la courbure externe du cœur. Les trabéculations marquent la première étape de la maturation cardiaque. La signalisation endocarde-myocarde agissant par l'intermédiaire de la gelée cardiaque est cruciale à la formation des trabécules durant la maturation des chambres myocardiques, ainsi qu'à la formation des bourrelets endocardiques vis-à-vis des parois myocardiques qui séparent les compartiments musculaires. Un des premiers indice qui a mené à suggérer que l'endocarde était nécessaire à la formation des trabécules a été fourni par le mutant *Cloche* chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). La mutation du gène *Cloche* est caractérisé par l'absence du feuillet endocardique dans le tube cardiaque, ce qui a pour effet d'empêcher la formation des trabécules et de contrarier le développement du myocarde [350, 351]. Parallèlement à cette découverte, des signaux impliqués dans le développement de l'endocarde ont été identifiés. La mutation du récepteur à tyrosine kinase FLK1 (VEGFR-2) résulte en l'absence de vasculogenèse, d'angiogenèse, et d'endocarde ainsi qu'en l'altération de la maturation du myocarde [76]. D'après les études de délétions chez la souris, l'expression endocardique de FLK1 et myocardique de VEGF sont requis pour la prolifération et l'initiation de la différenciation des cellules endocardiques, qui réciproquement induisent le développement des trabécules cardiaques [76, 352, 353]. La délétion totale ou conditionnelle de VEGF entraîne une hypotrabéculation sévère [354-356], tandis que sa surexpression engendre une hypertrabéculation du myocarde ventriculaire [357]. D'autres récepteurs à tyrosine kinase, tels que les TIE (Tyrosine kinase with Immunoglobulin-like loops and Epidermal growth factor homology domains), sont exprimés au niveau de l'endocarde tandis qu'un de leurs ligands (angiopoiétine-1) est sécrété par le myocarde. Les mutants de délétion pour l'*angiopoiétine-1* (myocardique) ou *Tie2* (endocardique) possèdent des cellules endocardiques dont la différenciation et la fonction semblent altérées, causant une hypotrabéculation du cœur [358-360]. La fonction endocardique de *Tie2* est corroborée par le phénotype hypotrabéculaire des cœurs des souris transgéniques pour l'*angiopoiétine-2*, un antagoniste naturel de *Tie2* [361]. L'angiopoiétine-1 synthétisée par le myocarde intervient donc dans la différenciation des cellules endocardiques, qui réciproquement sécrètent des facteurs paracrines induisant la formation des trabécules myocardiques.

La voie de signalisation *Notch* semble également jouer un rôle crucial dans la trabéculatation en coordonnant l'interaction entre le myocarde et l'endocarde. En effet, les souris déficientes pour *Notch1* ou *RBPj $\kappa$*  exhibent des défauts de trabéculatation, une réduction de la prolifération du myocarde ainsi qu'une atténuation de l'expression de gènes régulant la formation des trabécules tels que l'*EphrinB2* et la *Neuréguline1* (*Nrg1*). La voie *Notch* semble d'une part induire l'*EphrinB2* qui elle-même régule la *Neuréguline1* responsable de la stimulation de la trabéculatation, et d'autre part maintenir l'expression de *Bmp10* qui favorise la prolifération des cardiomyocytes présents au niveau des trabécules [73]. La NRG1 est un facteur paracrine dont l'expression est confinée au niveau de l'endocarde, et qui agit en se liant aux récepteurs à tyrosine kinase ErbB2 (HER-2) et ErbB4 (HER-4) exprimés à la surface des cardiomyocytes. L'interaction entre NRG1 et ses récepteurs est requise à la formation des trabécules, étant donné que les souris présentant une délétion de la *Nrg1* (endocardique) ou des récepteurs *ErbB2* et *ErbB4* (myocardique) ne forment aucune trabécule ventriculaire, tandis que la paroi compacte du myocarde est in affectée [362-367]. L'importance de cette voie de signalisation est également étayée par le mutant de délétion de la sérotonine (*5HT<sub>2B</sub><sup>-/-</sup>*), qui exprime des niveaux significativement réduits de *ErbB2* et exhibe, dans les cas les plus sévères, une hypotrabéculatation comme celle obtenue avec les mutants *ErbB2<sup>-/-</sup>* [368, 369]. Les souris *5HT<sub>2B</sub><sup>-/-</sup>* qui survivent présentent des cardiomyopathies sévères accompagnées d'une hypoplasie ventriculaire causée par la réduction du nombre et du volume des cardiomyocytes [368-370]. La régulation du développement des trabécules est donc sous l'influence des communications inter-cellulaire entre l'endocarde et le myocarde.

#### **1.1.6.3.1.3 Formation du myocarde compact (compaction myocardique)**

Parallèlement à la formation des trabécules au niveau de la paroi interne, le myocarde subit une période étendue de prolifération de la paroi externe des ventricules suivie d'une étape courte de compaction (entre E13 - E14) des portions basales des trabécules, qui corrèle avec l'établissement du système vasculaire coronarien [371, 372]. La paroi externe, qui continue à s'épaissir par l'addition de couches cellulaires successives, se discerne moléculairement et fonctionnellement

de la paroi trabéculaire. Certains gènes sont en effet exprimés selon des gradients transmuraux au niveau des ventricules. NPPA et la Connexin40 (CX40) sont par exemple exprimés plus fortement au niveau des trabécules, tandis que le récepteur de la Ryanodine (RyR) et SERCA2 sont fortement enrichis dans la paroi compacte [373]. Malgré l'existence de souris déficientes présentant des défauts de prolifération du myocarde compacte, peu de voies de signalisation responsables de la prolifération et de la compaction du myocarde ont été caractérisées. Parmi les facteurs paracrines sécrétés par l'endocarde, la NRG1 et l'IGF1 semblent agir de manière synergique dans la croissance et l'épaississement de la paroi compacte des ventricules. Individuellement, ces voies ne peuvent contrôler la croissance de la paroi compacte des ventricules; la voie *Nrg1* induit seulement la trabéculatation du myocarde tandis que la voie *Igf1* contrôle essentiellement la croissance cellulaire du cœur post-natal. Par contre, la conjonction de ces deux voies de signalisation durant l'embryogénèse régulent l'épaississement des parois ventriculaires compactes [374]. Hormis la participation de l'endocarde dans le développement de la paroi externe des ventricules, de plus en plus d'évidences pointent vers un rôle crucial de l'épicarde dans la prolifération, la croissance et la compaction des parois ventriculaires du myocarde.

#### **1.1.6.3.2 Interaction endocarde-myocarde dans le cœur adulte**

Bien que les cardiomyocytes représentent environ 75% de la masse tissulaire du cœur, leur nombre n'est estimé qu'à 25-30% de la totalité des cellules cardiaques; la majorité des cellules regroupent les cellules endothéliales, les cellules épicaudiques, les cellules du muscle lisse, les fibroblastes, et les monocytes/macrophages. Il est par ailleurs estimé que le ratio entre les cardiomyocytes et les capillaires avoisinants est de 1 :1 [302, 375]. Parmi ces différents types cellulaires, les cellules endothéliales contribuent à l'homéostasie cardio-vasculaire en régulant la perméabilité vasculaire, en ajustant le calibre des vaisseaux aux demandes hémodynamiques et hormonales mais aussi en maintenant la fluidité sanguine. Il est important de distinguer d'une part les cellules endothéliales des capillaires myocardiques et de l'endocarde, et d'autre part les cellules endothéliales des artères et veines coronariennes intra-myocardiques et



épicaudiques; ces dernières ne contrôlant que la fonction coronarienne tandis qu'elles affectent la fonction cardiaque indirectement en régulant l'alimentation sanguine au niveau du myocarde. Au contraire, les cellules endothéliales des capillaires myocardiens et de l'endocarde jouxtent les cardiomyocytes autorisant le transport physiologique par les capillaires et une communication intercellulaire directe entre ces deux types cellulaires [302]. Ces interactions myocarde-endocarde régulent la fonction et la croissance cardiaque ainsi que la réponse à des stimuli hypertrophiques, tels que des stress mécaniques et oxydatifs ainsi que des stimuli métaboliques, neuro-hormonaux et de croissance (en réaction à des facteurs de croissance) [302].

## **1.2 Régionalisation cardiaque des programmes transcriptionnels**

Les considérations à la fois ontogénique et phylogénique suggèrent que le cœur est un organe modulaire qui se caractérise par l'existence de divers domaines transcriptionnels. Les différents modules cardiaques possèdent une signature moléculaire unique qui émane de la régulation génique exclusive à chacun de ces domaines transcriptionnels. Dès le début de la cardiogénèse, des programmes transcriptionnels distincts gouvernent la diversification des progéniteurs cardiogènes et la compartimentation du tube cardiaque [78]. Les interactions complexes de facteurs de transcription au sein de réseaux de régulation génique (RRG) contrôlent spatio-temporellement la spécification, la détermination, et la différenciation des différentes populations cardiaques. La régionalisation transcriptionnelle au sein du mésoderme cardiogène reflète le " patterning " des champs cardiaques (CCP et CCS), qui s'initie préalablement à la formation et la segmentation morphologique du tube cardiaque linéaire (CCP). Le " patterning " des champs cardiogènes engendre une diversification cellulaire caractérisée par la génération de sous-populations de progéniteurs cardiogènes se distinguant par des signatures moléculaires distinctes, mais qui dérivent de précurseurs communs (voir section " 1.1.5 "). Chacune de ces sous-populations de progéniteurs cardiogènes convergent par la suite vers les diverses régions du tube cardiaque afin de générer les différentes structures cardiaques. Le modèle de " ballooning " adhère donc avec ce concept de modules cardiaques [78, 88, 376],

bien qu'il demeure imprécis sur la nécessité d'un " patterning " du CCS afin de générer différentes sous-populations cellulaires et sur le recrutement spatio-temporellement coordonné de ces diverses lignées cellulaires cardiogènes au cours de la cardiogénèse.

Le concept de modularité se retrouve également dans la régulation spatio-temporelle de l'expression génique qui est assurée par des éléments *cis*-régulateurs regroupés dans des modules, nommés enhancers. Le patron d'expression endogène d'un gène cardiaque découle donc des divers modules transcriptionnels localisés à des distances plus ou moins importantes du locus de ce même gène. Souvent, un enhancer contrôle l'expression d'un gène dans un territoire restreint du cœur qui délimite une sous-population cellulaire cardiaque spécifique. C'est pourquoi, de nombreux enhancers sont employés comme transgènes afin d'identifier les différentes sous-populations de progéniteurs cardiaques qui émergent des champs morphogénétiques cardiogènes (CCP et CCS). En outre, l'étude des enhancers et des facteurs de transcription les régulant permet de décrypter les RRGs fonctionnels au sein des différentes lignées cardiaques.

### **1.2.1 Facteurs de transcription impliqués dans la cardiogénèse**

La cardiogénèse nécessite une série d'évènements moléculaires et morphogénétiques précisément orchestrés spatio-temporellement, qui est sous le contrôle de programmes génétiques cardiaques coordonnés par de multiples facteurs de transcription. Plusieurs familles de facteurs transcriptionnels, jouant des rôles clés dans maintes étapes du développement cardiaque, seront abordées dans cette section.

#### **1.2.1.1 Famille des facteurs GATA**

Les protéines GATA sont une famille de facteurs de transcription phylogénétiquement conservés et qui possèdent des fonctions cruciales durant le développement des organismes eucaryotes. Ces facteurs se caractérisent par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN composé de deux doigts de zinc (Cys-

X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>17</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys) hautement conservés au travers des espèces, et qui lie une séquence cis-régulatrice consensus WGATAR. Chez les vertébrés, les six membres de la famille GATA (GATA1 à GATA6) se séparent en deux sous-groupes selon leur profil d'expression spatio-temporel, les facteurs GATA1/2/3 représentant le groupe hématopoïétique et GATA4/5/6 constituant le groupe cardiaque. La spécificité fonctionnelle des facteurs GATA est gouvernée en partie par des interactions combinatoires protéine-protéine avec d'autres partenaires transcriptionnels. De nombreux facteurs ubiquitaires et tissu- ou cellule-spécifique coopèrent avec les facteurs GATA afin de réguler spatio-temporellement l'expression de gènes cibles. L'activité des protéines GATA est également modulée par des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation, la phosphorylation, et la sumoylation. Ces modifications impliquent généralement un remaniement de l'activité transcriptionnelle résultant de changements dans la localisation nucléaire, la stabilité protéique, l'affinité de liaison à l'ADN et/ou le recrutement de cofacteurs.

Tel que mentionné précédemment, les facteurs GATA1/2/3 sont exprimés dans les lignées hématopoïétiques et sont essentiels à la prolifération des cellules souches hématopoïétiques, la différenciation des mégacaryocytes et des érythrocytes, ainsi qu'au développement des lymphocytes T. Leur expression n'est toutefois pas uniquement limitée aux cellules hématopoïétiques, mais s'étend également au cerveau, au tube neural et à l'oreille interne; structures dans lesquelles ils y jouent des rôles majeurs durant le développement. L'importance physiologique de ces facteurs GATA est supportée par l'identification récente de mutations génétiques associées à des maladies humaines, telles que l'anémie dysérythropoïétique et la thrombocytopénie (syndrome dû à une mutation de *GATA1*) [377], le syndrome HDR caractérisé par une hypoparathyroïdie, une surdité et une dysplasie rénale (dû à une mutation de *GATA3*) [378].

Les facteurs GATA4/5/6 sont majoritairement retrouvés dans les tissus dérivés du mésoderme et de l'endoderme tels que le cœur, l'intestin, et les gonades. Des mutations humaines de *GATA4* sont responsables de MCCs, essentiellement des ASDs [379, 380]. L'expression spatio-temporelle de ce groupe de facteurs GATA

est dynamique durant la cardiogénèse. Ce sont des marqueurs précoces du développement cardiaque étant donné que leur expression débute dès la formation du mésoderme pré-cardiaque vers E7,0. Durant l'élongation du tube cardiaque s'établit un gradient d'expression postéro-antérieur des facteurs GATA4/5/6, qui semble coïncider avec la colonisation du pôle artériel par les progéniteurs cardiaques du CCS. L'extension antérieure du domaine d'expression des facteurs GATA4/5/6 est consistant avec l'addition successive de progéniteurs du CCS responsables de la formation du ventricule droit et du tronc artériel [381]. Contrairement à la *Drosophila*, où la mutation de *Pannier*, l'orthologue des facteurs GATA, résulte en la totale absence de cardioblastes et une réduction des cellules péricardiques, les études de délétions chez la souris semblent indiquer que les facteurs GATA ne sont pas responsables de la spécification des progéniteurs cardiaques, à moins qu'il existe une redondance fonctionnelle entre ces trois facteurs GATA. En effet, la présence de deux des trois facteurs cardiaques GATA pourrait suppléer ou au moins compenser la perte de fonction du troisième facteur. Toutefois, chacune de ces protéines semblent posséder des fonctions propres. Ces facteurs GATA régulent également le développement de tissus extracardiaques. La souris déficiente pour *Gata4* décède vers E10,5 de défauts endodermiques caractérisés par un défaut de fermeture ventrale de l'embryon. Ces souris présentent également des *cardia bifida* suggérant que *Gata4* contrôle la migration des précurseurs du croissant cardiaque vers la ligne centrale ventrale où se forme normalement le cœur tubulaire [382, 383]. Les souris déficientes pour *Gata5* ne présentent aucun défaut cardiaque, tandis que les souris *Gata6*<sup>-/-</sup> meurent avant la formation du tube cardiaque (E7,5) de défauts extra-embryonnaire. La délétion de *Gata4*, *Gata5* ou *Gata6* n'empêche donc ni l'initiation de la cardiogénèse ni la différenciation des cardiomyocytes.

Les facteurs *Gata4* et *Gata6* régulent toutefois directement la morphogénèse cardiaque étant donné que les chimères d'agrégation tétraploïde de *Gata4*<sup>-/-</sup> et *Gata6*<sup>-/-</sup> meurent vers E10 de défauts cardiaques. Les chimères d'agrégation tétraploïde de *Gata4*<sup>-/-</sup> exhibent une absence d'inflexion et de cloisonnement du cœur, une absence de développement du proépicaarde, ainsi que la formation de ventricules hypotrabéculés et hypoplastiques résultant probablement de la

disparition des signaux normalement émis par l'épicarde. Les embryons des chimères d'agrégation tétraploïde de *Gata6*<sup>-/-</sup> sont plus petits que la normale lors de leur décès vers E10,5 et présentent un défaut majeur d'hépatogenèse et parfois une hypotrabéculatation ventriculaire. Les ablations ("knock-out") conditionnels de *Gata4* obtenus grâce au croisement avec les souris *Nkx2.5-Cre* exhibent un phénotype moins sévère que les chimères d'agrégation tétraploïde de *Gata4*<sup>-/-</sup>, mais meurent tout de même vers E11,5 en présentant une paroi myocardique aminci, résultant probablement d'une réduction de la prolifération des cardiomyocytes [384]. *Gata4* semble donc impliqué dans la prolifération et la survie cellulaire durant la cardiogénèse [385], mais également dans le cœur adulte [386].

#### 1.2.1.2 Famille des facteurs à homéodomaine : sous-famille NK-2

*Nkx2.5* (*Csx*) est un membre de la classe NK-2 de la famille phylogénétiquement conservée NK des gènes à homéodomaine. Cette protéine est un facteur activateur de la transcription qui est exprimée très précocement par les progéniteurs cardiogéniques du CCP et du CCS. L'importance de *Nkx2.5* dans la cardiogénèse a été reconnue suite à la découverte que la mutation de *Tinman*, l'orthologue de *Nkx2.5* chez la *Drosophile*, empêche le développement des muscles viscéraux et du vaisseau dorsal, l'organe équivalent au cœur des vertébrés [387]. Bien que *Tinman* soit indispensable à la spécification des cellules du vaisseau dorsal chez la *Drosophile*, *Nkx2.5* n'est pas requis pour la spécification et la détermination des progéniteurs cardiaques chez les vertébrés. Le phénotype cardiaque plus modeste chez la souris pourrait être attribué à l'existence d'une redondance fonctionnelle entre les différents membres de cette classe de facteurs NK-2, permettant de compenser pour l'absence de *Nkx2.5* et ainsi d'assurer aux précurseurs mésodermiques antéro-latéraux d'adopter un destin cardiaque. En effet, les embryons déficients pour *Nkx2.5* possèdent des cardiomyocytes doués de contractions, mais meurent vers E9,5 d'un retard de croissance et d'un arrêt de l'inflexion sigmoïde du tube cardiaque primitif [388-392]. Toutefois, à ce jour aucune étude exhaustive n'a été réalisée sur les profils d'expression cardiaques spatio-temporels des différents membres de cette famille de facteurs à homéodomaine.

Hormis le rôle crucial de *Nkx2.5* dans la morphogenèse cardiaque, ce facteur semble également contrôler une fraction significative du programme transcriptionnel cardiaque étant donné que l'expression de nombreux gènes cardiaques est altérée dans les embryons *Nkx2.5*<sup>-/-</sup>. Les mutations humaines de ce gène sont la cause de MCCs non-syndromiques [393]. Ces mutations autosomiques dominantes sont majoritairement responsables de troubles de conduction cardiaque et d'ASDs secundum, bien que d'autres anomalies aient été rapportées telles que des VSDs, des TOFs, des DORVs, des anomalies d'Ebstein et le syndrome d'hypoplasie du ventricule gauche [394-399]. Par conséquent, *NKX2.5* joue des rôles cruciaux dans la régulation transcriptionnelle qui est essentielle à la morphogenèse et la l'homéostasie du cœur durant la cardiogénèse et après la naissance. Durant la morphogenèse, *Nkx2.5* semble surtout impliqué dans l'inflexion sigmoïde, la spécification et le cloisonnement des cavités cardiaques, puis dans la maturation fonctionnelle ainsi que le maintien de l'homéostasie du myocarde et du système de conduction [400-403].

### 1.2.1.3 Famille des facteurs à boîte T

Les quelques 18 membres de la famille des facteurs de transcription à boîte T se caractérisent par leur domaine de liaison à l'ADN (boîte T ou T-box) hautement conservé, et qui se compose d'environ 180 acides aminés. Les facteurs T-box possèdent une myriade de fonctions cruciales durant le développement qu'il est difficile de catégoriser tant elles sont diverses. Tôt dans l'embryogénèse, il semble notamment émerger qu'un réseau de gènes T-box interagit avec les voies de signalisation *Wnt/β-caténine* et *Notch/Delta* afin de contrôler la spécification du mésoderme, la segmentation somitique ainsi que la détermination de l'asymétrie gauche-droite au niveau du disque embryonnaire [404]. Parmi les facteurs T-box de ce réseau, *Éomésodermine* est le régulateur le plus précoce de la formation du mésoderme en sus de son rôle antérieur dans la formation du trophoctoderme. Il est requis pour le développement du mésoderme embryonnaire et extra-embryonnaire. *Brachyury* (aussi nommé T) est un autre de ces facteurs T-box appartenant au réseau de gènes à boîte T impliqué dans le développement mésodermique. *Brachyury* est considéré comme un régulateur pan-

mésodermique requis de façon cellule-autonome pour la spécification et la survie des cellules de la notochorde, et de façon non-autonome pour le développement du mésoderme postérieur, incluant les somites postérieurs et l'allantoïde. Finalement, en aval d'*Éomésodermine* et de *Brachyury*, *Tbx6* est exprimé au niveau de la ligne primitive et du mésoderme présomitique [405, 406]. *Tbx6* est responsable de la spécification des somites étant donné que le mutant de délétion de ce gène chez la souris ne forme aucun somite postérieur, et à la place, le mésoderme présomitique se différencie en tubes neuraux ectopiques [406]. Hormis son rôle dans la spécification du mésoderme paraxial, *Tbx6* est également requis afin d'assurer le " patterning " rostro-caudal des somites [407-409].

Les facteurs T-box sont également indispensables à la cardiogénèse, étant donné qu'au moins sept membres de cette famille sont exprimés dans un des champs cardiaques ou directement dans le cœur (*Tbx-1*, -2, -3, -4, -5, -18, et -12/20) où ils y régulent un ou plusieurs processus morphogénétiques [410]. Parmi les fonctions, certains facteurs T-box semblent également contrôler le " patterning " et le positionnement précis des compartiments cardiaques le long du cœur tubulaire. Dans cette section, seules les fonctions cardiaques de ces facteurs T-box seront abordées avec une emphase particulière pour *Tbx5* et *Tbx20*.

#### 1.2.1.3.1 T-box 1 (*Tbx1*)

*Tbx1* est exprimé essentiellement au niveau de l'ectoderm, de l'endoderme et du mésoderme des arcs pharyngés dont le CCS [214, 222, 226, 227, 411-413], ce qui explique que le phénotype des souris *Tbx1*<sup>+/-</sup> phénocopie des aspects majeurs du syndrome de DiGeorge (SDG) (OMIM 188400), dont les malformations du tronc artériel (PTA, DORV, TOF) [214, 215, 222-229, 414]. En effet, le SDG (incidence : 1 naissance sur 4000), aussi connu sous le nom de syndrome vélocardiofacial (SVCF) (OMIM 192430) ou de syndrome del22q11, est causé par une délétion génomique de 1,5 à 3 Mb au niveau du chromosome 22q11.2 chez les humains [415-417], et se caractérise par des troubles comportementaux [418] ainsi qu'une variété de malformations congénitales incluant l'absence ou l'hypoplasie du thymus et des glandes parathyroïdes, les dimorphismes faciaux dont le bec de

lièvre, et les anomalies cardiovasculaires telles que les malformations des arcs aortiques et les défauts de septation du tronc artériel et des ventricules [419-421]. Toutes ces structures dérivent du mésoderme localisé au niveau des arcs pharyngés où *Tbx1* est fortement exprimé. Étant donné que la délétion du locus 22q11.2 entraîne l'haploinsuffisance de plusieurs gènes dont, en particulier, TBX1, il est cohérent de constater des similarités entre le phénotype des souris *Tbx1*<sup>+/-</sup> et les patients humains atteints du SDG. TBX1 semble donc en partie responsable des MCCs relevées dans le SDG [225, 420], d'autant plus que de rares patients humains affectés par le SDG possèdent uniquement des mutations au niveau du gène TBX1, sans exhiber de délétion du chromosome 22q11.2 [418, 422-425].

Chez la souris, l'ablation conditionnelle de *Tbx1*, inducible par la tamoxifène, a mis en évidence que *Tbx1* intervient à différentes étapes de l'embryogénèse afin de générer les diverses structures cardiaques et extracardiaques. Ces études ont démontré un rôle précoce (entre E7,5 et E8,5) crucial de *Tbx1* dans la morphogénèse des arcs pharyngés caudaux 3 à 6, et particulièrement dans la prolifération de l'endoderme pharyngé, tandis que la septation du tronc artériel requiert *Tbx1* à des stades plus tardifs (entre E8,5 et E9,5), et coïncident avec le recrutement des progéniteurs du CCS au niveau du pôle artériel du tube cardiaque [426]. Les malformations du tronc artériel causées par l'haploinsuffisance de *Tbx1* chez la souris résultent principalement de l'hypo-prolifération cellule non-autonome des progéniteurs du CCS, qui se caractérise initialement par l'aplasie ou l'hypoplasie du 4<sup>ème</sup> arc aortique, puis d'un recrutement affaibli de progéniteurs au niveau du tronc artériel [48, 214, 226, 414, 427-429]. Des analyses de filiation cellulaire ont en effet déterminé que les progéniteurs du CCS *Tbx1*<sup>+</sup> contribuent à la formation du ventricule droit, de l'infundibulum du ventricule droit, de tronc pulmonaire, et des valves pulmonaires [48, 226, 414, 427]. En outre, l'expression de *Tbx1* dans l'ectoderme des arcs pharyngés est vitale au contrôle de la migration des CNCCs durant le développement des arcs aortiques [414, 430, 431]. Par conséquent, *Tbx1* régulent à la fois la prolifération des progéniteurs du CCS et la migration des CNCCs, ce qui explique les malformations des arcs aortiques et du tronc artériel constatées dans le SDG étant donné que ces structures cardiaques dérivent de ces deux lignées cellulaires. En revanche, la pénétrance et



l'expressivité des différentes malformations congénitales observés dans le SDG chez la souris dépendent fortement du contexte génétique [432] et du dosage de *Tbx1* [226, 433]. La dépendance des phénotypes du SDG au dosage de *Tbx1* est d'ailleurs supportée par l'absence de MCCs chez certains patients humains dont la microdélétion du locus 22q11 est compensée par une duplication de ce même locus au niveau de leur génome [434, 435]. En revanche, les mutations de *TBX1* qui engendrent un gain-de-fonction exhibent un phénotype analogue aux délétions 22q11.2 ou aux mutations *TBX1*, qui sont associées à une perte de fonction de ce gène T-box [424].

#### 1.2.1.3.2 T-box 2 (*Tbx2*)

Le positionnement précis des compartiments cardiaques le long du cœur tubulaire primordial semble également contrôlé, en partie, par les facteurs T-box. En effet, les régions qui ne forment pas les chambres cardiaques (sinus veineux, canal AV, courbure interne du cœur, et tronc artériel) possèdent un programme transcriptionnel répresseur de la différenciation myocardique. Dans ces régions, des facteurs T-box répresseurs (*Tbx2* et *Tbx3*) sont exprimés afin d'inhiber le programme de différenciation des chambres cardiaques (inhibition de *Nppa* et *Connexin 40*), en compétitionnant avec le facteur T-box activateur *Tbx5* [436-439]. Ainsi, *Tbx2* est essentiel au maintien de l'identité cardiomyocytaire spécifique au myocarde du tube cardiaque primaire [88] et donc à la morphogenèse des structures cardiaques dans lesquels ce type d'identité cardiomyocytaire est requise, tels que dans le canal AV [436-445], la courbure interne du cœur, le pôle veineux, et le tronc artériel (pôle artériel) [436, 438]. Il n'est donc par surprenant de constater que des microdélétions [446] ou une duplication [447] du locus englobant le gène *TBX2* résulte en l'émergence de MCCs au niveau des structures cardiaques qui dérivent des progéniteurs cardiogènes *TBX2*<sup>+</sup>. En effet, une duplication de 131 kb du locus 17q23.2, qui englobe 3 gènes (*BCAS3*, *TBX2*, et *C17orf82*), a été identifiée chez un individu présentant des malformations du squelette et des MCCs (CIV, PFO, retour veineux pulmonaire anormal, coarctation de l'aorte, sténose de la valve mitrale, et une insuffisance de la valve tricuspide) [447]. La fonction supposée de *Tbx2* dans la morphogenèse du tronc artériel et

des valves du canal AV chez la souris [95, 436, 437, 448] suggère que l'augmentation du dosage de *TBX2* est à l'origine de ces MCCs. En revanche, d'autres patients humains porteurs d'une micro-délétion de 2,2 à 2,8 Mb au niveau du chromosome 17q23.1-q23.2, qui englobe plusieurs gènes dont *TBX2* et *TBX4*, exhibent de multiples malformations musculo-squelettiques et des MCCs (PDA, ASD secundum, et valve aortique bicuspidale) [446]. La similarité entre les MCCs chez ces individus et le phénotype de certaines souris *Tbx2*<sup>-/-</sup> (anomalies du canal AV et du tronc artériel, dont DORV) [438] suggère que *TBX2* est à l'origine de ces malformations. Les phénotypes de ces patients humains semblent donc supporter l'importance du dosage de *TBX2*, et peut-être de *TBX4*, durant le développement du canal AV et du tronc artériel.

L'expression régionalisée de *Tbx2* au niveau du canal AV, de la courbure interne du cœur, et du tronc artériel durant la cardiogénèse sous-estime le nombre de cellules filles dérivant des progéniteurs *Tbx2*<sup>+</sup> qui intègrent ultimement les structures cardiaques adjacentes. En effet, une étude de filiation cellulaire a mis en évidence que le myocarde provenant de la sous-population des progéniteurs *Tbx2*<sup>+</sup> n'est pas uniquement confinée au canal AV et au tronc artériel, mais que la base du ventricule gauche adjacent au canal AV, une portion importante de la paroi ventriculaire gauche (à l'exception de l'apex et le côté gauche de l'IVS), la majorité du myocarde du ventricule droit et du tronc artériel, le mésenchyme de la protrusion dorsale mésenchymateuse originant du CCS postérieur, le septum auriculaire, et le myocarde auriculaire médiastinal (à l'exception du reste des oreillettes) dérivent également de la sous-population initialement *Tbx2*<sup>+</sup> [95]. Toutefois, l'expression de *Tbx2* ne persiste qu'au niveau du myocarde du canal AV, de la courbure interne du cœur, et du tronc artériel afin d'assurer le " patterning " de ces régions cardiaques [436-439, 444, 449], tandis qu'elle s'amenuise et disparaît sous l'influence de *Tbx20* dans les cellules filles qui intègrent les ventricules [448] afin de ne pas interférer avec la prolifération cardiomyocytaire et le programme de différenciation des chambres myocardiques, tous deux nécessaires au processus de " ballooning ". La surexpression ectopique de *Tbx2* dans le CCP, accomplie par transgénèse chez la souris, réprime en effet la prolifération des cardiomyocytes au sein du cœur tubulaire et altère en sus le déploiement des progéniteurs du CCS au niveau

du tronc artériel [450]. L'altération du recrutement des progéniteurs du CCS s'accompagne d'une réduction de l'expression de *Tbx20* exclusivement au niveau du CCS, tandis que son expression demeure normale dans le tube cardiaque. L'expression ectopique de *Tbx2* au niveau du CCP semble donc bouleverser soit l'environnement cellulaire et la matrice extra-cellulaire du tronc artériel soit la stimulation des voies de signalisation qui influencent normalement la migration des progéniteurs du CCS [450]. Au contraire, l'ablation totale de *Tbx2* engendre un accroissement de la prolifération du myocarde de la jonction AV gauche, évocateur de la prolifération cardiomyocytaires au sein des chambres ventriculaires, ainsi qu'un défaut de " patterning " du myocarde du canal AV gauche [444]. L'altération du " patterning " du canal AV entraîne une malformation de l'anneau fibreux auriculo-ventriculaire (*annulus fibrosus cordis*), qui normalement isole électriquement le myocarde auriculaire du myocarde ventriculaire, et une pré-excitation des ventricules résultant de la formation de voies de conduction électriques accessoires, telles que des faisceaux de His accessoires. Le RRG du canal AV, sous contrôle de *Tbx2*, est donc indispensable à la morphogénèse de l'anneau fibreux AV et empêche le myocarde de la jonction AV d'acquérir des propriétés de conduction électrique rapide qui entraînerait une pré-excitation ventriculaire à la place du délai AV nécessaire à des contractions séquentielles synchronisées des oreillettes puis des ventricules. Malgré les malformations de l'anneau fibreux AV observées chez les souris *Tbx2*<sup>-/-</sup>, certaines régions, telles que la paroi droite du canal AV, ne sont pas affectées. L'expression robuste de *Tbx3* au niveau de ces autres régions du canal AV semble être à l'origine de leur développement normal, probablement parce que *Tbx3* compense pour l'absence de *Tbx2* [95, 444].

#### 1.2.1.3.3 T-box 3 (*Tbx3*)

À l'instar de nombreux gènes T-box, les mutations autosomiques dominantes *TBX3* sont associées à de multiples malformations congénitales, qui dans le cas de ce gène compose le syndrome de Schinzel (syndrome ulno-mammaire ou syndrome cubito-mammaire) (OMIM 181450) [451, 452]. Les malformations d'expressivité variables répertoriées dans ce syndrome de Schinzel se

caractérisent par l'hypoplasie des glandes apocrines axillaires et mammaires, des malformations au niveau des structures des membres antérieurs (hypoplasie de l'ulna (cubitus) et des phalanges postérieures jusqu'à l'absence totale du bras ou de l'avant-bras), et des anomalies génitales (hypogonadisme) et dentaires. Les embryons/fœtus murins *Tbx3*<sup>-/-</sup> arborent des malformations similaires à celles observées dans le syndrome de Schinzel ainsi qu'une dégénérescence du sac vitellin causant leur décès entre E11,5 et E16,5 [453]. La cardiogénèse est également perturbée puisque des malformations du canal AV [439], du système de conduction cardiaque [454-456], et du tronc artériel (DORV, CIV, TGV) [455, 457] ont été répertoriées parmi les fœtus *Tbx3*<sup>-/-</sup>. Toutefois, l'expressivité des MCCs observées chez les souris *Tbx3*<sup>-/-</sup> contraste avec le faible taux de MCCs identifiées chez les patients humains atteints du syndrome de Schinzel, puisque seulement deux cas présentent des CIVs, une sténose de l'artère pulmonaire, et des anomalies du système de conduction cardiaque en conjonction aux malformations naturellement constatées dans ce syndrome [458, 459]. Cette différence inter-espèce dans le développement de MCCs s'ajoute également au fait que seuls les fœtus murins homozygotes *Tbx3*<sup>-/-</sup> exhibent des malformations similaires à celles des patients humains haploinsuffisant *TBX3*<sup>+/-</sup>, tandis que les souris *Tbx3*<sup>+/-</sup> sont viables et fertiles et n'exhibent aucune malformation à l'exception de quelques rares dissimilitudes morphologiques au niveau de l'appareil génital [453].

Tel que mentionné précédemment, les facteurs de transcription *Tbx2* et *Tbx3* sont des répresseurs du programme de différenciation myocardique des chambres cardiaques [439, 460, 461]. Ils interviennent donc dans le positionnement précis des compartiments cardiaques le long du cœur tubulaire primitif grâce à leur expression régionalisée au niveau du sinus veineux (pôle veineux), du canal AV, de la courbure interne du cœur, et du tronc artériel (pôle artériel). L'ablation de *Tbx3* n'affecte pas la spécification du myocarde AV, mais est requis pour sa différenciation et la régulation de la prolifération des cardiomyocytes au niveau du canal AV [439]. Une autre étude semble toutefois soutenir que seul *Tbx2* est indispensable au " patterning " du canal AV, tandis que *Tbx3*, exprimé dans les CNCCs et l'endoderme pharyngé, n'est requis qu'indirectement pour le déploiement adéquat des progéniteurs du CCS au niveau du pôle artériel, afin de

garantir l'inflexion sigmoïde du cœur et la juxtaposition appropriée des cavités cardiaques, de l'aorte, et de l'artère pulmonaire. D'après cette étude, la prolifération excessive et l'altération de la différenciation des progéniteurs du CCS des embryons *Tbx3*<sup>-/-</sup> affectent leur déploiement au niveau du tronc artériel, ce qui entraîne des défauts d'alignement du canal AV, caractérisés par une connexion de l'oreillette droite avec le ventricule gauche (une condition nommée ventricule gauche à double entrée (en anglais, " *double inlet left ventricle* ")), ainsi que des malformations du tronc artériel (DORV, CIV, TGV) et des arcs aortiques [457]. Hormis son rôle dans la morphogenèse du tronc artériel, *Tbx3* est également requis dans la différenciation du nœud sinusal (nœud sino-auriculaire, nœud de Keith et Flack, ou *nodus sinuatrialis*) et du nœud auriculo-ventriculaire (nœud d'Aschoff-Tawara) en réprimant l'identité auriculaire myocardique des précurseurs mésenchymateux dans lesquels il est exprimé [454, 456, 461-463], tandis qu'il assure la spécification du faisceau de His et des branches proximales du faisceau hissien en contrecarrant l'activation du programme de différenciation ventriculaire spécifique aux chambres myocardiques qui avoisinent le faisceau de His [455]. En outre, bien que l'ablation de *Tbx3* ne soit pas suffisante pour empêcher la formation du nœud sinusal [456], la surexpression ectopique de *Tbx3* suffit à réprimer l'expression du programme de différenciation auriculaire myocardique et à induire la formation des foyers pacemaker ectopiques, qui entraînent des arythmies cardiaques [454]. Par conséquent, *Tbx3* est crucial pour le développement de l'ensemble du système de conduction cardiaque. Chez l'humain comme chez la souris, l'haploinsuffisance de *Tbx3* n'engendre aucune altération de la conduction électrique, ce qui suggère que la dose réduite de *Tbx3* demeure suffisante afin d'assurer la morphogenèse du système de conduction cardiaque. Le seul indice qui pourrait corrélérer *TBX3* au système de conduction cardiaque chez l'humain est la découverte, au cours d'une vaste étude d'association pangénomique, d'un SNP localisé approximativement 224 kb en amont du locus *TBX3-TBX5* qui est associé à une prolongation du l'intervalle PR, ce qui accroît le risque d'infarctus du myocarde [464].

#### **1.2.1.3.4 T-box 18 (*Tbx18*)**

*Tbx18* est un gène T-box primordial au maintien de la polarité antéro-postérieur des somites puisque son ablation génétique entraîne des malformations congénitales sévères du squelette, causant le décès des souris *Tbx18*<sup>-/-</sup> juste après la naissance [465]. Les souris *Tbx18*<sup>-/-</sup> exhibent également des hydro-uretères et des hydronéphroses résultant de l'hypo-prolifération et d'un défaut de différenciation du mésenchyme de l'uretère en cellules musculaires lisses [466]. Finalement, *Tbx18* est aussi essentiel à la formation des deux cornes sinusales à partir de progéniteurs cardiogènes situés au pôle veineux du tube cardiaque [467]. En fait, au niveau du mésoderme splanchnique cardiogène, l'expression de *Tbx18* s'initie dans une sous-population de progéniteurs cardiaque (*Isl1*<sup>-</sup>; *Nkx2.5*<sup>+</sup>), qui semble se partitionner très précocement du CCS (*Isl1*<sup>+</sup>; *Nkx2.5*<sup>+</sup>). Cette sous-population se subdivise par la suite en au moins deux autres sous-populations, l'une générant les cellules pro-épicardiques (*Tbx18*<sup>+</sup>; *Wt1*<sup>+</sup>), et l'autre contribuant au myocarde des deux cornes sinusales qui assurera la morphogenèse des veines caves supérieur et inférieur en amont des valves veineuses au niveau de l'oreillette droite [245, 467-470]. Bien qu'il soit exprimé dans les progéniteurs pro-épicardiques, *Tbx18* n'est pas nécessaire à leur genèse puisque l'ablation totale de *Tbx18* n'affecte pas le développement du PEO [467]. Une troisième sous-population de progéniteurs se scindent de la population principale de précurseurs *Tbx18*<sup>+</sup>; ces progéniteurs cardiogènes (*Isl1*<sup>+</sup>; *Nkx2.5*<sup>-</sup>; *Tbx18*<sup>+</sup>) localisés dans la région limitrophe entre la sous-population de progéniteur (*Isl1*<sup>-</sup>; *Nkx2.5*<sup>+</sup>; *Tbx18*<sup>+</sup>) du sinus veineux et celle des progéniteurs (*Isl1*<sup>+</sup>; *Nkx2.5*<sup>+</sup>; *Tbx18*<sup>-</sup>) du CCS contribue à la formation du nœud sinusal. En fait, *Tbx18* assure la spécification et la différenciation du nœud sinusal en réprimant l'identité auriculaire myocardique des précurseurs mésenchymateux dans lesquels il est exprimé [456]. De surcroît, *Tbx18* est requis en amont de *Tbx3* étant donné que l'ablation de *Tbx18* engendre une absence totale de nœud sinusal, tandis que l'ablation de *Tbx3* n'entraîne qu'un défaut de différenciation des cellules conductrices au sein du nœud sinusal. À l'instar de *Tbx3*, l'altération de la spécification et/ou la différenciation des progéniteurs *Tbx18*<sup>+</sup> pourrait être à l'origine d'arythmies auriculaires (ex: fibrillation auriculaire) chez l'humain. Cependant, malgré les multiples fonctions répertoriées chez la souris, *TBX18* n'est

encore associé à aucun syndrome chez l'humain, bien que ce facteur T-box soit considéré comme un gène candidat de l'ectrodactylie [471].

#### 1.2.1.3.5 T-box 20 (*Tbx20*)

Le facteur de transcription *Tbx20*, dont au moins 4 isoformes alternatifs ont été détectés (*Tbx20a*, *Tbx20b* (*Tbx12*), *Tbx20c*, et *Tbx20d*) [472-474], n'est exprimé qu'au niveau du CCP et dans une sous-population restreinte de progéniteurs du CCS [230-232, 475]. La délétion de *Tbx20* provoque une hypoplasie sévère du tube cardiaque [230-233], résultant très probablement d'un défaut de déploiement ou de recrutement des progéniteurs du CCS, puisque ce champ morphogénétique est primairement responsable de l'élongation du cœur tubulaire, la prolifération cellulaire ne jouant qu'un rôle secondaire. Cette hypothèse semble renforcée par le phénotype intermédiaire des embryons où *Tbx20* est partiellement réduit par ARNi; les cœurs de ces embryons exhibent une hypoplasie du tronc artériel et du ventricule droit, qui sont des structures cardiaques dérivées du CCS [230].

*Tbx20* semble également indispensable à la répression de *Tbx2* au niveau des chambres cardiaques. En effet, *Tbx2* est exprimé ectopiquement dans l'ébauche cardiaque des mutants *Tbx20* [231-233], ce qui suggère que l'hypoplasie sévère exhibée par ces mutants résulterait en partie de la capacité de *Tbx2* à induire le programme transcriptionnel répresseur de la différenciation myocardique des chambres myocardiques, normalement uniquement activé au niveau du myocarde du canal AV et du tronc artériel [436-438, 440-445]. En fait, *Tbx20* semble effectivement requis afin de réprimer *Tbx2* dans les chambres myocardiques, et de confiner l'expression de ce facteur T-box au niveau du canal AV [448]. Une étude récente démontre effectivement que la surexpression de *Tbx2* dans le CCP entraîne une réduction de la prolifération cardiomyocytaires au niveau du tube cardiaque et une altération du recrutement des progéniteurs depuis le CCS, bien que le transgène *Tbx2* n'y soit pas exprimé. L'expression ectopique de *Tbx2* dans le CCP engendre également une réduction de l'expression de *Tbx20* exclusivement au niveau du CCS, tandis que son expression demeure normale dans le CCP, ce qui suggère que *Tbx2* bouleverse soit l'environnement cellulaire du

tronc artériel soit la stimulation des voies de signalisation qui influencent normalement la migration des progéniteurs du CCS [450]. L'inhibition de *Tbx2* via *Tbx20* dans les chambres myocardiques [231-233], ainsi que la diminution de l'expression de *Tbx20* au niveau du CCS suite à une surexpression ectopique de *Tbx2* [450] suggèrent qu'une régulation transcriptionnelle croisée complexe entre ces deux facteurs T-box s'opère dans diverses régions cardiaques. En revanche, la fonction de *Tbx20* au niveau du CCS semble renforcée par sa capacité à activer de manière dose-dépendante des gènes indispensables au développement du CCS tels que *Mef2c* et *Nkx2.5* [230, 231]. Hormis son rôle au niveau du CCS, *Tbx20* intervient aussi directement dans la morphogenèse des valves du canal AV chez la souris, en garantissant la prolifération des cellules mésenchymateuses préalablement à la phase de remodelage des valves [448, 476]. Des mutations humaines de *TBX20* supportent le rôle crucial de ce gène T-box dans la valvulogénèse, la septation cardiaque, et la croissance cardiaque, étant donné que les individus porteurs de ces mutations exhibent des MCCs émanant de l'altération de ces processus morphogénétiques, tels que les FOPs, les CIAs, les CIVs, les TOFs, les sténoses ou les prolapsus de la valve mitrale, les anomalies de connections des veines pulmonaires, et les cardiomyopathies dilatées [477-479].

#### 1.2.1.3.6 T-box 5 (*Tbx5*)

Le facteur de transcription *Tbx5* joue un rôle crucial dans le " patterning " antéro-postérieur du tube cardiaque primitif. L'acide rétinoïque possède une fonction permissive dans la formation du gradient antéro-postérieur croissant de *Tbx5* [53, 119, 480] qui se localise presque exclusivement au niveau du CCP, à l'exception d'une sous-population de progéniteurs du CCS se situant de la région dorso-caudale du tube cardiaque [475]. Conformément à son profil d'expression spatio-temporel, l'ablation génétique complète de *Tbx5* chez la souris provoque une hypoplasie drastique de la région sino-auriculaire [481], suggérant un rôle critique soit dans la différenciation des progéniteurs du CCP, soit dans la prolifération ou le recrutement de progéniteurs cardiaques du CCS au niveau du pôle veineux. Un rôle crucial de *Tbx5* dans la différenciation des progéniteurs cardiaques des segments postérieurs du CCP (oreillettes et ventricule gauche) est



supporté par la capacité de *Tbx5* de promouvoir la différenciation de cellules mésodermiques en cardiomyocytes [482-491]. Conjointement à l'altération de la différenciation des cardiomyocytes de la région sino-auriculaire, un défaut de prolifération des progéniteurs cardiaques du CCP est étayé par une fonction potentielle de *Tbx5* dans la prolifération cellulaire. Des expériences de " knock-down " chez le *Xénope* ont en effet suggéré que *Tbx5* est impliqué dans la prolifération cellulaire en favorisant la progression de la transition G<sub>1</sub>/S du cycle cellulaire [492]. Une étude de surexpression de *Tbx5* chez le poulet démontre au contraire que *Tbx5* possède une fonction anti-proliférative cellule non-autonome durant la cardiogénèse [493]. La divergence de conclusions entre ces expériences pourrait tenir au fait que la surexpression de *Tbx5* chez le poulet succédait à l'initiation de la différenciation des cardiomyocytes, tandis que le " knock-down " de *Tbx5* chez le *Xénope* a été réalisé par à la micro-injection de morpholinos dès le stade de 1 cellule [492]. Une fonction pro-proliférative de *Tbx5* dans les stades précoces de la cardiogénèse est donc tout à fait plausible. En revanche, la fonction potentiel de *Tbx5* dans la migration cellulaire des progéniteurs cardiaques est supportée par l'altération de la migration des précurseurs mésodermiques vers les nageoires pectorales chez le poisson zébre, suite au " knock-down " de *Tbx5* [494]. La dérégulation de l'expression de *Tbx5* semble également inhiber la migration des cellules pro-épicaudiques de façon cellule autonome, étant donné que l'inactivation de *Tbx5* dans des explants de PEO conduit à une inhibition de la migration des cellules pro-épicaudiques hors du PEO. Toutefois, la surexpression de *Tbx5* dans le PEO inhibe également la migration des cellules pro-épicaudiques hors du PEO. Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par le fait que la migration des cellules pro-épicaudiques et épicaudiques dépend d'une régulation dynamique précise de la fonction de *Tbx5* selon que les cellules alternent entre des états stationnaires et migratoires durant le développement; les cellules pro-épicaudiques stationnaires exprimeraient *Tbx5* tandis que les cellules pro-épicaudiques migratoires ne l'exprimeraient plus. La régulation dynamique de l'expression de *Tbx5* permettrait donc de moduler la migration des cellules pro-épicaudiques et épicaudiques jusqu'à leur destination finale au niveau du myocarde, où elles se différencieraient ensuite en cellules musculaires lisses, fibroblastes, ou cardiomyocytes [495]. En outre, la modulation de l'activité

transcriptionnelle de *Tbx5*, et donc de son effet sur la migration cellulaire, semble également assurée par la relocalisation subcellulaire de *Tbx5* dans les cellules pro-épicaudales et épicaudales par *Pdlim7* (LMP4). Des immunofluorescences sur des tissus cardiaques ont en effet mis en évidence que, durant la différenciation des cellules épicaudales, *Tbx5* semble partiellement circonscrit au niveau du cytoplasme grâce à son interaction avec *Pdlim7*, empêchant ainsi *Tbx5* de manifester son activité transcriptionnelle au niveau du noyau [496].

L'identité des différentes chambres cardiaques semble également contrôlée selon le niveau d'expression de *Tbx5*. Tel que mentionné, la sévérité du phénotype chez la souris *Tbx5*<sup>-/-</sup> au niveau des différentes structures cardiaques est corrélée avec le gradient d'expression antéro-postérieur croissant de *Tbx5* normalement présent au niveau du CCP. La robustesse de l'expression auriculaire de *Tbx5* par rapport à l'expression ventriculaire semble contribuer au développement des parois minces des oreillettes contrairement aux parois épaisses et trabéculées des ventricules. En effet, la surexpression de *Tbx5* dans les ventricules grâce au transgène  $\beta$ -MHC-*Tbx5* entraîne un amincissement des parois ventriculaires avec une réduction de la trabéculatation, comparable à une auricularisation du myocarde ventriculaire [480]. Toutefois, ce ventricule dépourvu de septum interventriculaire (IVS) maintient une identité de ventricule gauche (ventricule systémique). En revanche, la surexpression de *Tbx5* grâce au transgène MLC-2v-*Tbx5*, spécifique au ventricule droit (ventricule pulmonaire) et au tronc artériel, transforme le ventricule droit en un ventricule d'identité gauche. Cette étude a également démontré l'importance de la présence d'un domaine *Tbx5* entre les deux ventricules, quelque soit leur identité, afin de générer le septum inter-ventriculaire. Cette hypothèse semble étayée par la formation d'une structure analogue à un IVS au sein même du ventricule droit chez des poulets infectés par un virus RCAS porteur d'un transgène EGFP-*Tbx5*. L'infection du ventricule droit par ce transgène engendre la formation de ce IVS supplémentaire entre la zone de forte expression ectopique de EGFP-*Tbx5* et la zone négative pour l'expression de *Tbx5* au sein du ventricule droit [497]. De surcroît, le sulcus inter-ventriculaire, au niveau duquel *Tbx5* est faiblement exprimé, semble être sous l'influence d'une boucle d'action directe secondaire négative (" *negative feed-forward circuit* ") impliquant *Tbx5* et

*Sall4*. Dans ce RRG, le facteur de transcription *Tbx5* active l'expression de *Sall4* au niveau du sulcus inter-ventriculaire, qui a son tour inhibe l'activation de gènes cibles de *Tbx5*, tels que *Nppa*, afin d'assurer la morphogenèse du septum inter-ventriculaire [498]. Par conséquent, conjointement à la spécification de l'identité du ventricule gauche, *Tbx5* contrôle la morphogenèse de certaines structures cardiaques, telles que le septum inter-auriculaire [481], le septum inter-ventriculaire [481, 497, 499], et le système de conduction cardiaque [401, 481, 500]. La morphogenèse de ces diverses structures cardiaques s'accomplit par la régulation de gènes qui y sont spécifiques, tels que *MYH6* dont la mutation chez l'humain entraîne des CIAs, et dont la régulation transcriptionnelle auriculaire semble être assurée par *TBX5* [488, 501].

Par ailleurs, les interactions combinatoires entre *TBX5* et certains de ses partenaires, tels que *NKX2.5*, *GATA4/5/6* et *SALL4*, autorise la formation de réseaux transcriptionnels responsables du développement des cloisons inter-auriculaires et inter-ventriculaires [379, 481, 482, 498, 502]. Notamment, *Tbx5* et *Nkx2.5* interviennent de façon coopérative dans le " patterning " des compartiments cardiaques et la morphogenèse des septums via l'activation de gènes (*Nppa*, *Cx40*) spécifiques à ces régions myocardiques [481, 482]. Similairement aux défauts de cloisonnement répertoriés chez les mutants de délétion de ces différents facteurs chez la souris (*Tbx5* [481, 498], *Gata4* [380], *Nkx2.5* [390-392], *Sall4* [498, 503]), des défauts de septation auriculaire sont également associés avec des mutations humaines de *TBX5* (syndrome d'Holt-Oram) (OMIM 142900) [504-506], *GATA4* [379, 380], et *NKX2.5* [394-400], renforçant ainsi l'hypothèse d'un réseau transcriptionnel contrôlant la morphogenèse de ces structures cardiaques. Les interactions combinatoires entre *Tbx5*, *Gata4*, et *Baf60c* ont notamment démontré une aptitude à induire la différenciation cardiaque ectopique du mésoderme cardiaque et du mésoderme non-cardiogène (mésoderme postérieur et mésoderme extra-cardiaque de l'amnios) [489].

En dépit des multiples fonctions cardiaques et extra-cardiaques associées à *Tbx5* dans les différents modèles animaux, les mécanismes moléculaires

conduisant aux diverses malformations congénitales caractéristiques du syndrome d'Holt-Oram (SHO) demeurent méconnus. Le SHO, dont la prévalence est de 1/100 000 naissances [504-506], est causé par des mutations autosomiques dominantes du gène *TBX5* localisé sur le chromosome humain 12q24.1. Les symptômes associés au SHO sont des malformations uni- ou bilatérales des membres supérieurs (pouce triphalangé, apalasia ou hypoplasie du pouce, phocomélie, hypoplasie sévère des membres supérieurs, pronation et supination anormales de l'avant-bras, épaules tombantes, et restriction des mouvements au niveau de l'articulation de l'épaule) et des MCCs [504-508]. Généralement, les patients atteints du SHO se catégorisent en trois groupes distincts: ceux exhibant uniquement des malformations des membres supérieurs (27.4%), uniquement des MCCs (3.4%), ou une combinaison des deux types de malformations (68.7%) [509]. Les MCCs les plus fréquentes dans le SHO sont les communications inter-auriculaires (CIAs) de type II (CIA II ou ASD II) ou des communications inter-ventriculaires (CIVs) bien que de nombreuses autres MCCs aient été répertoriées (défauts de septation auriculo-ventriculaire, malformation de la valve mitrale, tétralogie de Fallot, syndrome cardiaque gauche hypoplastique, anomalies de l'implantation des veines pulmonaires, structures des trabécules myocardiaques anormales, et des anomalies du système de conduction entraînant fréquemment des blocs auriculo-ventriculaires progressifs et/ou des fibrillations auriculaires...) [510]. La diversité des malformations au sein du SHO est souvent la cause d'un taux de détection faible de mutation au niveau du gène *TBX5*. Toutefois, une étude a démontré que l'utilisation de critères stringents (critères personnels et/ou historique familiale de défauts de septation cardiaque et/ou de défauts de conduction en conjonction à des malformations pré-axiales des membres supérieurs) afin de diagnostiquer le SHO, permet d'augmenter la sensibilité de génotypage de *TBX5* à 74%, associée à une spécificité estimée de 100% [511, 512].

En outre, la variation importante d'expressivité et de pénétrance intra- et inter-familiale de ces malformations empêche d'établir une corrélation entre le type de mutation et les malformations engendrées, bien que certaines familles exhibent davantage de malformations d'un certain type [507, 513, 514]. Approximativement

70% des mutations introduisent un codon stop prématuré, ce qui généralement entraîne une haploinsuffisance puisque la majorité des mutations se localisent dans le domaine à boîte T de liaison à l'ADN [515]. Les mutations faux-sens qui n'affectent pas le dosage de l'expression de *TBX5* ont généralement tendances à entraîner peu de manifestations cardio-vasculaires. Ce type de mutations faux-sens exhibe régulièrement une prédominance de malformations squelettiques ou cardiaques comparée aux familles présentant des mutations non-sens haploinsuffisantes [508]. Certaines mutations engendrant également un gain-de-fonction (ex: G125R) qui génèrent des malformations modérées des membres supérieurs et moins fréquemment des MCCs, bien que les patients porteurs de cette mutation développent une fibrillation auriculaire paroxystique [516]. Une cause potentiel de ce phénotype serait une induction ectopique de *TBX3*, étant donné que l'expression de ce gène est très sensible à la dose de *TBX5* [517]. En outre, *Tbx3* est crucial au développement du système de conduction cardiaque, notamment du nœud sinusal [454-456, 461-463]. La sur-expression de *Tbx3* entraîne d'ailleurs l'induction ectopique du programme de différenciation du pacemaker cardiaque, qui est un précurseur de fibrillation auriculaire [454]. Par conséquent, le gain-de-fonction du mutant G125R de *TBX5* est probablement à l'origine d'une induction auriculaire ectopique de *TBX3* qui engendrerait le phénotype de fibrillation auriculaire paroxysmale développé par les patients porteurs de cette mutation [516].

Tel que mentionné, la variation importante d'expressivité et de pénétrance intra- et inter-familiale des malformations du SHO empêche d'établir toute corrélation entre le type de mutation et les malformations engendrées [507, 513]. La variation de la pénétrance et de l'expressivité des MCCs dans le SHO, même pour une mutation identique de *TBX5*, résultent donc probablement de l'influence de divers facteurs génétiques (combinaison de multiples loci polymorphiques), environnementaux et/ou stochastiques [507, 518]. L'existence d'interaction génétique occasionnant le développement de MCCs a d'ailleurs été démontrée récemment chez des souris dans lesquelles la sévérité des MCCs dépendaient d'une interdépendance entre les niveaux d'expression de *Brg1* et des facteurs cardiogéniques à l'origine de MCCs, tels que *Tbx5*, *Tbx20*, ou *Nkx2.5* [519].

Hormis les mutations autosomiques dominantes de *TBX5* responsables du SHO, des SNPs associés à des altérations électrophysiologiques ont été localisés au niveau du locus *TBX3-TBX5*. Le SNP (rs3825214) situé dans le dernier intron du gène *TBX5* est significativement associé dans une population islandaise avec une prolongation des intervalles PR et QT, un allongement de la durée du complexe QRS, un risque accru de bloc auriculo-ventriculaire avancé (2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> degré), ainsi qu'un risque diminué de fibrillation auriculaire [520]. Le risque accru de blocs auriculo-ventriculaire concorde avec les troubles de conduction cardiaque auriculo-ventriculaire observés chez les patients atteints du SHO. Par contre, la fibrillation auriculaire paroxysmale a été retrouvée dans une famille atteinte d'un SHO atypique, puisque les individus la composant sont porteurs d'une mutation gain-de-fonction de *TBX5*, contrairement à l'haploinsuffisance typiquement observée chez les patients touchés par le SHO [516]. Un autre SNP (rs7312625) situé non loin du précédent SNP (rs3825214) dans le dernier exon de *TBX5* est également corrélé à une prolongation de l'intervalle PR dans des cohortes Afro-Américaines [521]. Hormis les SNPs situés à l'intérieur du gène, d'autres SNPs en amont du locus *TBX3-TBX5* sont également associés à des altérations du système cardio-vasculaire. Un de ces SNPs (rs1896312), localisé approximativement 224 kb en amont du locus *TBX3-TBX5*, est associé dans sept populations de descendance Européennes à une prolongation de l'intervalle PR, ce qui accroît le risque d'infarctus du myocarde [464]. En revanche, le SNP (rs2384550) situé environ 231 kb en amont du locus *TBX3-TBX5* a été associé dans des populations de descendance Européennes [522] et Afro-Américaines [523] à une pression diastolique sanguine élevée, qui est un facteur de risque majeur d'exacerbation de maladies cardio-vasculaires [524]. Par conséquent, au-delà des mutations autosomiques dominantes engendrant le SHO, *TBX5* est un gène susceptible d'influencer la conduction cardiaque, et donc d'exacerber les troubles de conduction cardiaque associés à des mutations affectant d'autres gènes.

### 1.3 Malformations congénitales cardiaques et pathologies cardiaques

Les maladies cardiovasculaires sont parmi les affections les plus sérieuses dans les pays occidentaux. Elles sont responsables de 40% de la mortalité aux

États-Unis (environ 1 million de personnes par an), avec environ un quart de ces cas étant des morts subites. La prévalence s'accroît progressivement avec l'âge, avec 5% de cas chez les adultes de 20 ans et 75% chez les personnes âgées de plus de 75 ans. En 2002, aux États-Unis, plus d'une personne sur cinq (62 millions d'américains) était atteinte d'une maladie cardiovasculaire (incluant l'hypertension). Approximativement 6,5 millions d'américains souffrent d'angine de poitrine et plus d'un million subissent un infarctus du myocarde chaque année. La prévalence des maladies cardiovasculaires, surtout les maladies des artères coronariennes, augmentent de façon alarmante en Chine, en Inde, au Pakistan, et au Moyen-Orient à mesure que la mortalité causée par les infections et la malnutrition décline dans ces régions. Il est projeté qu'en 2020 les maladies cardiovasculaires seront la cause prédominante de mortalité dans le monde [525].

Les causes des maladies cardiovasculaires sont multiples. Elles peuvent résulter d'ischémie myocardique, de cardiomyopathies, d'hypertension vasculaire, de malformations congénitales, d'infections, de désordre métabolique, d'intoxication, de maladie auto-immune, ou encore de malnutrition. Aux États-Unis et en Europe occidentale, les maladies cardiaques ischémiques représentent trois quarts de l'ensemble des insuffisances cardiaques. Les cardiomyopathies sont la deuxième cause la plus fréquente de défaillance cardiaque, suivies par les malformations congénitales, les valvulopathies, et les hypertensions. Hormis les causes primaires de maladies cardiovasculaires, il existe de multiples facteurs aggravants (infections, arythmies, facteurs environnementaux, facteurs diététiques, facteurs émotionnels, facteurs physiques, grossesse, infarctus du myocarde, embolie pulmonaire, aggravation de l'hypertension) qui précipitent la défaillance cardiaque [525].

### **1.3.1 Malformations congénitales cardiaques (MCCs)**

Dans cette section, seules les MCCs seront abordées. Les MCCs représentent les anomalies du développement embryonnaire et fœtal les plus fréquentes, dont la prévalence varie approximativement entre 0.8% à 1.2% des naissances [526-528]. La grande majorité des études épidémiologiques exclut toutefois les

anomalies telles que les valves aortiques bicuspidées et les retours veineux pulmonaires anormaux, qui ont respectivement une prévalence élevée de 1.3% et 0.6% à eux seuls [529], ainsi que le prolapsus de la valve mitrale, le syndrome de Marfan, les cardiomyopathies, et les arrhythmies congénitales [530]. De surcroît, la prévalence des MCCs désigne généralement le nombre de patients nés avec une MCC auquel il est soustrait les patients décédés ou ceux dont leur MCC, tel qu'un défaut de septation ou la persistance du canal artériel, s'est spontanément résorbée. La variabilité de la prévalence des MCCs provient donc de la divergence de définitions, de classifications et de méthodologies des différentes études épidémiologiques [530]. Par conséquent, une estimation conservatrice de la prévalence des MCCs peut atteindre 5% des naissances lorsque sont pris en considération les malformations telles que les anévrysmes du septum inter-auriculaire, la persistance de la veine cave supérieure gauche, les valves aortiques bicuspidées, et les retours veineux pulmonaires anormaux [531].

L'incidence des MCCs parmi les enfants prématurés semble être environ 2,5 fois plus élevée que pour les enfants qui arrivent à terme. En outre, 16% de l'ensemble des enfants exhibant des MCCs sont prématurés [532]. Les MCCs sont une cause majeure de mortalité et de morbidité durant la période périnatale. Selon différentes études, au terme de la première année d'existence des nouveau-nés présentant des MCCs, le taux de mortalité varie entre 4% [528] et 12% [532] chez les enfants nés à terme contre 20% chez les enfants prématurés [532]. Dans les pays occidentaux, les MCCs sont responsables de 6% à 10% de la mortalité infantile et 20% à 40% de la mortalité parmi l'ensemble des nouveau-nés exhibant des malformations [533]. Approximativement 15% des MCCs exhibent un risque élevé pour la survie du nouveau-né, certains sous-groupes d'anomalies présentant davantage de dangers tels que l'hypoplasie du ventricule gauche, l'atrésie pulmonaire, la transposition des gros vaisseaux (TGV) et l'interruption de l'arc aortique. Parmi ces MCCs graves à risque, le taux de mortalité dans la première année après la naissance est passé de 50% à 20% en 20 ans, grâce à une amélioration et une augmentation substantielle des diagnostics prénataux et néonataux ainsi qu'une meilleure prise en charge des patients [533]. Toutefois, certaines études rapportent qu'entre 28% et 58% des grossesses sont



interrompues lorsque des MCCs sévères sont détectés lors de diagnostics prénataux par ultrasonographie, et seraient de ce fait responsables d'une réduction d'environ 21% de la prévalence des MCCs [534, 535]. En outre, au-delà de 40% des nouveau-nés exhibant des MCCs subissent une opération cardio-chirurgicale et/ou un cathétérisme cardiaque. Toutefois, ces multiples avancées en chirurgie et médecine cardio-vasculaire, qui favorise la prolongation de la survie des individus atteints de MCCs, n'empêchent pas que nombre de ces patients souffrent ultimement de complications cardio-vasculaires telles que des arrhythmies, des endocardites, d'hypertension artérielle pulmonaire, et d'insuffisance cardiaque [530, 536]. Dans les 20 dernières années, la mortalité parmi les patients porteurs de MCCs a décliné de 50% à 70% selon le type de malformation [537]. En revanche, la proportion de décès non-cardiovasculaires dans la population adulte avec des MCCs a augmenté de 17% à 23% dans les 10 dernières années [538, 539], ce qui suggère que ces patients vivent de plus en plus longtemps pour développer des affections liées à l'âge telles que le cancer.

Parmi l'ensemble des MCCs, certaines sont bénignes ou même indétectables chez les nouveau-nés car asymptomatiques, mais progressent en défaillance cardiaque chez l'enfant, l'adolescent ou l'adulte [525]. L'incidence réelle des MCCs est donc sous-estimée due à l'existence des MCCs asymptomatiques non diagnostiquées avant la décharge du nouveau-né de l'hôpital, et qui représentent approximativement 30% des cas de MCCs; les MCCs les plus fréquemment non détectées étant la coarctation aortique, l'interruption de l'arc aortique, la sténose valvulaire aortique, l'anomalie de la connexion veineuse pulmonaire, les cardiomyopathies, et le foramen ovale perméable persistant [533]. Au contraire, les cardiopathies complexes ( $\approx$  30% des MCCs) [528], présentant au moins deux anomalies cardiaques distinctes (ex : anomalies du canal AV, transposition des gros vaisseaux (TGV), Tétralogie de Fallot (TOF)), représentent près de la moitié des cas d'interruptions médicales de grossesse. En revanche, selon les études épidémiologiques, au-delà de 70% à 80% des MCCs sont des cas isolés, c'est-à-dire que les individus touchés ne présentent aucune autre malformation extracardiaque en association avec leur(s) MCC(s). Par contre, environ 22% des individus présentant des MCCs possèdent également d'autres malformations

extracardiaques, dont approximativement 54% correspondent à des syndromes ( $\approx$  12% des MCCs) [527].

Actuellement, environ 12% à 18% des MCCs, généralement syndromiques, ont des origines génétiques connues [540, 541]. En l'occurrence, 8-13% des MCCs sont causées par des aberrations chromosomiques (ex : Trisomie 13, Trisomie 18, Trisomie 21), tandis que 3-5% des MCCs, souvent associées à des malformations extra-cardiaques, sont la conséquence de mutations monogéniques (ex : *TBX5* pour le Syndrome d'Holt-Oram (SHO) [504-506], *JAGGED1* pour le syndrome d'Alagille [331-333, 530, 542]). En outre, environ 2% des MCCs non-syndromiques peuvent être attribués à des facteurs environnementaux, tels que le diabète mellitus (diabète sucré) ou la phénylcétonurie maternelle [543]. D'autres facteurs environnementaux de risques majeurs de MCCs sont l'obésité maternelle, la consommation d'alcool ou de tabac, les infections virales (ex : rubéole), les maladies fébriles, l'utilisation de certains médicaments tels que la thalidomide ou l'acide rétinoïque, et l'exposition à des solvants organiques [530]. Par conséquent, approximativement 83% des MCCs résiduelles semblent d'origines multigéniques et/ou multifactorielles [544], ce qui implique l'interaction d'une multitude de gènes de susceptibilité [545-550] avec des facteurs environnementaux tels que des infections, des intoxications [548], l'alcoolisme, la consommation de tabac [549], l'hyperhomocystéinémie [551], et la déficience en nutriments [546-548, 552]. La majorité des MCCs non-syndromiques apparaissent sporadiquement, et seules une minorité ont une origine monogéniques avec un peu plus de 40 gènes caractérisés à ce jour [553, 554]. Les mutations des gènes impliqués dans le développement de MCCs isolées sont toutefois associées à des pénétrances phénotypiques variables. La pénétrance des MCCs est élevée pour certains gènes tels que *GATA4* [379, 380], *NKX2.5* [393], *TBX20* [477], ou *ZIC3* [555-559], tandis qu'elle l'est moins pour d'autres gènes, supportant ainsi l'hypothèse de l'étiologie multifactorielle de la plupart de MCCs [544, 553]. Par conséquent, l'identification des facteurs génétiques et/ou environnementaux responsables des MCCs demeure crucial afin d'améliorer les diagnostics prénataux et d'implémenter des mesures préventives ou palliatives [530].

### **1.3.1.1 Cardiopathies congénitales isolées acyanogènes sans shunt**

Les cardiopathies congénitales acyanogènes sans shunt regroupent des malformations altérant la moitié gauche ou droite du cœur. Parmi les MCCs de la moitié gauche du cœur se distinguent les régurgitations mitrales ou aortiques, les sténoses aortiques, les coarctations aortiques, et certaines obstructions congénitales au niveau de l'oreillette gauche telles que les sténoses des veines pulmonaires et les sténoses mitrales. Les MCCs de la moitié droite du cœur regroupent les sténoses pulmonaires sans CIV et les régurgitations de la valve de l'artère pulmonaire. L'ensemble de ces MCCs ne provoquent aucune cyanose chez le nourrisson et sont pour la plupart difficiles à diagnostiquer car elles sont généralement asymptomatiques. Les sténoses aortiques congénitales sont des malformations qui causent une obstruction au niveau de l'aorte (voie d'éjection du ventricule gauche) et entraînant généralement une hypertrophie concentrique du ventricule gauche chez l'adulte du fait de l'élévation chronique de la pression hémodynamique. Les sténoses aortiques se subdivisent en plusieurs types d'anomalies tels que la sténose aortique valvulaire ou supra-valvulaire, et la sténose subaortique [525]. La sténose aortique valvulaire est fréquemment causée par une valve aortique bicuspidie qui est une des plus fréquentes MCC, avec une incidence de 1.3% [525, 529]. Bien que cette anomalie n'engendre pas obligatoirement de sténose aortique durant l'enfance, elle se développe souvent avec l'âge en sténose sévère via la calcification de la valve aortique, en endocardites infectieuses, ou en dissection aortique [560]. Une autre anomalie majeure est la coarctation aortique qui correspond à un rétrécissement ou une constriction de la lumière de l'aorte et qui se retrouve dans 5% à 7% des patients atteints d'une MCC [525, 528]. Cette malformation est critique dans un tiers des cas et requiert absolument une opération chirurgicale (coarctectomie). Les deux tiers restants sont asymptomatiques durant l'enfance mais entraînent sur le long terme des hypertrophies cardiaques congestives, des dissections aortiques, ou des endocardites; elles doivent donc être traitées par une opération chirurgicale [560], qui est effectuée dans certains pays durant la première année postnatale dans plus de 90% des coarctations aortiques [528]. Finalement, la sténose pulmonaire se caractérise par une obstruction de la voie d'éjection du ventricule

droit au niveau supravalvulaire, valvulaire et/ou subvalvulaire de l'artère pulmonaire, ce qui se traduit à long terme par une hypertrophie du ventricule droit [525].

### **1.3.1.2 Cardiopathies congénitales isolées acyanogènes avec shunt gauche-droit**

Les cardiopathies congénitales acyanogènes avec shunt gauche-droit se caractérisent par le mélange du sang systémique et veineux mais ne provoque pas ou peu de cyanose. Ces MCCs regroupent majoritairement les défauts de septation auriculaires (ASD) et ventriculaires (VSD) qui résultent d'une déhiscence persistante ou d'une perforation au sein d'un septum cardiaque. Les communications inter-ventriculaires (CIVs) sont parmi les MCCs les plus répandus ( $\approx 35\%$ ), bien que leur proportion varie drastiquement selon les études épidémiologiques (30% à 56%) [527, 528]. Les récentes études dans lesquelles des échocardiographies ont été réalisées précocement chez les nouveau-nés suspectés de posséder des MCCs détectent un grand nombre de CIVs, pouvant représenter jusqu'à 56% de toutes les MCCs. Le dépistage d'une proportion élevée de CIVs a donc une influence sur l'incidence totale des MCCs [527, 560]. L'étude dans laquelle les CIVs ont été identifiés précocement a mis en évidence une majorité de CIVs localisées au niveau de la cloison musculaire ( $\approx 81\%$ ), tandis qu'une minorité de ces CIVs ( $\approx 19\%$ ) se situe dans la portion conique membraneuse du septum [527]. Toutefois, la majorité des CIVs musculaires (76% à 95%) se referment spontanément au cours de la première année postnatale [527, 560, 561]. Par contre, seulement 27% des CIVs membraneuses se referment spontanément durant ce même intervalle [527].

Les communications inter-auriculaires (CIAs) sont les malformations les plus répandues (11% à 18% des MCCs) après les CIVs [527, 528]. Divers types de CIAs existent, tels que les CIAs de type I (anomalie de l'ostium primum) ( $\approx 15\%$ ), les CIAs de type II (anomalie de l'ostium secundum) ( $\approx 75\%$ ), et les CIAs du sinus veineux ( $\approx 10\%$ ) qui sont causés par le décalage vers la gauche (lévoposition) de l'abouchement d'une veine cave, généralement de la veine cave supérieur et plus

rarement de la veine cave inférieure ou du sinus coronaire, jusqu'à sa superposition avec le septum inter-auriculaire. L'ensemble de ces CIAs ne doivent pas être confondues avec les FOPs (foramen ovale perméable persistant) qui résultent du défaut d'obturation du foramen ovale, normalement réalisée par l'adhérence de la valvule de Vieussens (Valvule du foramen ovale) à la cloison inter-auriculaire juste après la naissance. Les CIAs sont à l'origine des shunts gauche-droit post-nataux, causés par l'élévation de la pression sanguine dans l'oreillette gauche suivant le déclenchement de la circulation pulmonaire. Du sang oxygéné, normalement destiné à la circulation générale systémique, traverse la CIA vers l'oreillette droite, ce qui augmente le volume sanguin dans l'oreillette puis le ventricule droit se traduisant par une surcharge volumique de sang dans la circulation pulmonaire. Lorsque cette CIA est importante et n'est pas réparée, la surcharge volumique entraîne une hypertrophie excentrique de l'oreillette et du ventricule droit, une hypervolumie pulmonaire accompagnée d'une hypervascularisation pulmonaire qui engendre une hypertension artérielle pulmonaire [525, 562-564]. L'accroissement de la pression sanguine dans l'oreillette droite, provoqué par l'hypertrophie auriculaire, engendre un shunt bidirectionnel puis droit-gauche lorsque la pression de l'oreillette droite finit par dépasser celle de l'oreillette gauche. L'inversion du shunt inter-auriculaire entraîne une cyanose caractéristique du syndrome d'Eisenmenger provoquée par l'appauvrissement du sang en oxygène puisqu'une partie du sang est court-circuitée vers la circulation systémique sans passer par la circulation pulmonaire. Les patients possédant de larges CIAs développent avec l'âge des arythmies auriculaires, une hypertension artérielle pulmonaire et des infarctus du myocarde [525, 565].

Parmi les MCCs avec shunt gauche-droit, il existe également le canal artériel persistant (PDA ou patent ductus arteriosus) (3% à 4% des MCCs) qui correspond à l'état pathologique résultant du défaut d'obturation physiologique du canal artériel à la naissance [525, 527, 528]. Le canal artériel est un vaisseau qui relie l'artère pulmonaire à l'aorte afin d'assurer la circulation sanguine fœtale. Toutefois, ce canal artériel se ferme immédiatement après la naissance. Le PDA se transforme donc en un shunt artério-veineux (gauche-droit) qui n'entraîne pas de cyanose

puisque le sang reste correctement oxygéné. Toutefois, l'augmentation du volume sanguin dans la circulation pulmonaire entraîne une surcharge volumique du côté gauche du cœur qui se traduit après plusieurs mois ou plusieurs années en une hypertrophie excentrique du ventricule gauche et une inversion du shunt. La transformation du shunt gauche-droit en shunt droit-gauche fait apparaître une cyanose. Les causes majeures de mortalité chez les adultes avec un PDA sont l'infarctus du myocarde et l'endocardite infectieuse et occasionnellement des obstructions vasculaires pulmonaires sévères [525].

### **1.3.1.3 Cardiopathies congénitales isolées cyanogènes avec augmentation de la circulation pulmonaire**

Les deux cardiopathies cyanogènes majeures de cette classe de MCCs sont la transposition des gros vaisseaux (TGV ou TGA en anglais) et le cœur univentriculaire. La TGV est une condition pathologique qui se caractérise par une malposition des gros vaisseaux à la base du cœur, de sorte que l'aorte est issue du ventricule droit antérieurement et à la droite de l'artère pulmonaire qui émerge du ventricule gauche [525]. La TGV est la deuxième MCC cyanogène la plus fréquente chez les nouveau-nés ( $\approx 3\%$  des MCCs) après la Tétralogie de Fallot ( $\approx 6\%$ ) [525, 528]. La plupart des patients présentant une TGV possèdent également un ASD, deux tiers des patients ont un PDA, et un tiers des patients ont un VSD. Une chirurgie correctrice est indispensable afin de détransposer les gros vaisseaux, et ainsi de réimplanter l'aorte sur le ventricule gauche et l'artère pulmonaire sur le ventricule droit [525]. La deuxième cardiopathie cyanogène est le cœur univentriculaire ( $\approx 1\%$  des MCCs), qui est une malformation cardiaque caractérisée par la présence d'une seule cavité ventriculaire [525, 528]. Cette anomalie est responsable d'un shunt gauche-droit significatif qui cause rapidement une hypertension artérielle pulmonaire [525].

### **1.3.1.4 Cardiopathies congénitales isolées cyanogènes avec diminution de la circulation pulmonaire**

Cette classe de MCCs regroupe la Tétralogie de Fallot ( $\approx 6\%$ ), l'atrésie tricuspide ( $\approx 0.4\%$ ), et l'anomalie d'Ebstein ( $\approx 0.3\%$ ) [525, 528]. La MCC cyanogène la plus fréquente, la Tétralogie de Fallot, est une cardiopathie congénitale complexe car elle regroupe 4 anomalies différentes qui sont la sténose pulmonaire, la CIV au niveau du septum conal membraneux, la dextroposition de l'aorte et l'hypertrophie du ventricule droit secondaire à l'élévation de pression causée par la sténose pulmonaire. La sténose pulmonaire, ou l'atrésie pulmonaire dans les cas les plus sévères, s'accompagne d'une réduction drastique de la circulation pulmonaire et d'un shunt droit-gauche du sang systémique veineux désaturé à travers la CIV, ce qui a pour conséquence une cyanose sévère. L'atrésie tricuspide est une MCC caractérisé par une imperforation (atrésie) de la valve tricuspide et généralement une CIA ainsi qu'une hypoplasie du ventricule droit et de l'artère pulmonaire. Une cyanose sévère résulte du mélange du sang systémique et pulmonaire au niveau du ventricule gauche. Finalement, l'anomalie d'Ebstein est la conséquence d'une implantation trop basse de la valve tricuspide dans le ventricule droit. Cette dysplasie de la valve tricuspide entraîne une régurgitation tricuspide. L'oreillette droite, composée de l'oreillette droite normale et de la portion proximale auricularisée du ventricule droit, se dilate, tandis que le ventricule droit est hypoplastique. Cette dysplasie tricuspide est généralement accompagnée d'une CIA résultant alors en cardiopathie cyanogène [525].

### **1.3.1.5 Cardiopathies congénitales complexes et syndromes cardiaques**

Tel que mentionné auparavant, approximativement 12% des MCCs font partie de syndromes, c'est-à-dire qu'un ensemble d'anomalies (symptômes) extracardiaques sont associées aux malformations cardiaques [528]. Les aberrations chromosomiques ou les mutations monogéniques ont été identifiés pour un grand nombre de ces syndromes. Le syndrome de Holt-Oram est un cas classique de MCCs complexes (CIA, CIV musculaire, trabéculatation ventriculaire anormale, retour veineux anormal, et/ou troubles de la conduction cardiaque) auxquelles sont associées des anomalies extracardiaques, telles que la phocomélie, l'aplasie du pouce, la présence d'un pouce triphalangé, la présence

de malformations des avant-bras, des mains et/ou des doigts [505, 506]. Cette pathologie est causée par une mutation du gène *TBX5* qui se transmet sur un mode autosomique dominant bien que 85% des patients soient porteurs *de novo*.

#### **1.4 Homéostasie cardiovasculaire et hypertrophie cardiaque**

L'homéostasie cardiovasculaire est assurée en partie par la fonction endocrine du cœur et la capacité du myocarde à s'adapter aux variations des demandes en nutriments et en oxygène de l'organisme. Lorsque les exigences physiologiques sont accrues ou diminuées, la charge de travail du cœur est respectivement augmentée ou réduite. D'après la formule de Laplace relative au stress des parois myocardiques, ce dernier est proportionnel à la pression et au volume ventriculaire, et inversement proportionnel à l'épaisseur du myocarde. Par conséquent, l'augmentation ou la diminution de la pression et/ou du volume sanguin sont respectivement compensées par un accroissement (hypertrophie), ou une réduction (hypotrophie) de l'épaisseur des parois ventriculaire, afin de normaliser le stress cardiaque (tension des parois myocardiques ventriculaires). Hormis l'hypotrophie cardiaque, qui ne sera pas abordée dans cette section, deux types d'hypertrophie cardiaque, physiologique ou pathologique, se distinguent selon le type de stimuli qui déclenchent et/ou accompagnent l'accroissement de la charge de travail du cœur. Quelle qu'elle soit, l'hypertrophie cardiaque se caractérise par l'augmentation de la masse du muscle cardiaque en réponse à de multiples stimuli hémodynamiques, tels que l'accroissement de la pression et/ou du volume sanguin du cœur. Au niveau moléculaire, cellulaire, et tissulaire, la réponse hypertrophique compensatrice bénéfique caractéristique de l'hypertrophie physiologique se distingue de la réponse désadaptée et délétère de l'hypertrophie pathologique. L'hypertrophie pathologique morbide, qui se développe fréquemment chez les patients atteints de MCCs, résulte en une insuffisance cardiaque et ultimement à la mort. Conjointement à l'augmentation de la masse musculaire caractéristique de l'hypertrophie pathologique, les différentes lignées cellulaires du cœur synthétisent une pléthore de modulateurs de l'homéostasie cardiovasculaire afin de réguler la réponse hypertrophique. Dans cette section, suite à une brève description des deux types d'hypertrophie cardiaque, seuls seront abordés deux



systèmes cardioprotecteurs, aux propriétés hypotensives et hypovolumiques, que sont les facteurs natriurétiques et l'oxyde nitrique (NO).

#### **1.4.1 Hypertrophie physiologique du cœur**

L'hypertrophie physiologique est une augmentation généralisée de la masse du myocarde, comme pour tout autre muscle, en réponse à une sollicitation accrue liée à un accroissement de la charge de travail durant la grossesse, un effort prolongé (ex : entraînement physique), ou la croissance post-natale. Cette adaptation compensatrice proportionnelle à l'intensité de la charge de travail est bénéfique au cœur tant et aussi longtemps qu'elle ne se transforme pas en hypertrophie pathologique, qui est reconnue pour être un facteur de risque majeur de morbidité et de mortalité [375]. Durant un entraînement prolongé, l'hypertrophie physiologique est une adaptation rapide du myocarde qui s'établit essentiellement en trois phases (la phase initiale, la phase tardive, et la phase compensée). Dans les premières 48 heures de la phase initiale, l'expression des gènes associés à l'activité métabolique est diminuée, tandis que celle des gènes impliqués dans la biosynthèse protéique mitochondriale est augmentée. Puis, toujours au cours de l'étape initiale de l'hypertrophie physiologique (dans la première semaine), les gènes associés à la glycolyse, à la croissance cellulaire, et aux protéines du cytosquelette sont rapidement activés. Cette réponse physiologique initiale permet aux cardiomyocytes de satisfaire aux demandes accrues en énergie et d'adapter leur cyto-architecture à l'augmentation de leur volume cellulaire. Certains autres gènes, tels que les gènes embryonnaires/foëtaux, sont transitoirement activés mais retournent à un niveau d'expression basal dans la phase tardive (après la première semaine), comme pour la plupart des autres gènes ayant subi de fortes variations de leur expression au cours de la phase initiale de l'hypertrophie physiologique [566]. Cette adaptation cardiaque est transitoire et le cœur retrouve sa taille normale lorsque la charge de travail diminue de nouveau.

#### **1.4.2 Hypertrophie pathologique du cœur**

L'hypertrophie pathologique se caractérise par une croissance hypertrophique d'une partie plus ou moins importante du myocarde en réponse à une demande accrue et prolongée du travail cardiaque, qui est causée par une grande variété de stimuli tels que des cardiomyopathies, des perturbations de la contraction et/ou de la relaxation du myocarde, des aberrations du rythme ou de la fréquence cardiaque (arythmies), des ischémies myocardiques (qui provoquent une déperdition de cardiomyocytes), des obstructions de la circulation sanguine, des élévations de la pression sanguine (ex : hypertension artérielle), des malformations cardiaques (ex : sténose aortique), ou des altérations du métabolisme cardiaque. L'insuffisance cardiaque (ou défaillance cardiaque), dont sont atteints environ 5 millions d'américains, se caractérise par une anomalie de la fonction et/ou de la structure cardiaque qui résulte en l'incapacité du cœur à assurer un débit sanguin suffisant afin de couvrir les besoins énergétiques de l'organisme. L'hypertrophie pathologique est donc une réponse compensatrice du myocarde à des facteurs délétères extrinsèques ou intrinsèques au cœur. Cette réponse compensatrice est adaptative (bénéfique) à court terme mais se transforme en réponse désadaptée (délétère) à long terme. L'évolution des cardiopathies hypertrophiques dépend essentiellement des causes des anomalie(s) fonctionnelle(s) et/ou structurale(s) cardiaques et du type d'insuffisance cardiaque qui s'installe. La phase délétère de l'hypertrophie pathologique apparaît généralement lorsque l'hypertrophie compensatrice est insuffisante pour restaurer une tension normale des parois myocardiques, ce qui se traduit par une dilatation des ventricules. Cette dilatation ventriculaire engendre à son tour une élévation de la tension des parois ventriculaires, conduisant ainsi à un cercle vicieux exacerbant l'insuffisance cardiaque.

Le type de remodelage intervenant durant l'hypertrophie pathologique dépend essentiellement du caractère de la surcharge hémodynamique chronique à laquelle le cœur est soumis. Lorsqu'une surcharge hémodynamique chronique est volumique (ex : lors de régurgitation valvulaire), le cœur développe une hypertrophie pathologique excentrique qui se caractérise par une dilatation de la cavité ventriculaire ainsi qu'une hypertrophie du myocarde. Par contre, lors d'une élévation chronique de la pression hémodynamique (ex : lors d'une sténose

aortique valvulaire), le cœur développe une hypertrophie pathologique concentrique qui se caractérise par l'augmentation du ratio entre l'épaisseur du myocarde et le diamètre de la cavité ventriculaire. Dans ces deux types d'hypertrophie, la tension des parois ventriculaires est maintenue et la fonction cardiaque peut demeurer stable pendant plusieurs années avant de se détériorer en insuffisance cardiaque. En effet, l'hypertrophie graduelle et la déperdition des cardiomyocytes conduisent ultimement à une insuffisance cardiaque sévère et à la mort.

Les mécanismes moléculaires responsables de la transition d'une hypertrophie compensatrice (physiologique) à une hypertrophie délétère (pathologique) sont toutefois majoritairement méconnus. Au niveau cellulaire, l'hypertrophie cardiaque se caractérise par un accroissement de la taille et non du nombre des cardiomyocytes, étant donné que ces derniers perdent leur capacité à se diviser peu de temps après la naissance (quelques jours chez la souris). Par conséquent, tous traumatismes ou lésions du myocarde provoquant l'apoptose ou la nécrose des cardiomyocytes engendrent une diminution irréversible de leur population [77], bien que quelques études récentes aient démontrées l'existence d'une régénération cardiomyocytaire très limitée, qui est assurée par des cellules souches résidentes et/ou circulantes [567, 568]. La faible capacité des cardiomyocytes à proliférer contribue donc probablement à l'irréversibilité des infarctus du myocarde. Durant l'hypertrophie, la croissance volumétrique des cellules est observée dans quasiment toutes les populations cellulaires du cœur, avec toutefois des accroissements de volumes plus importants pour les cardiomyocytes et les fibroblastes. Hormis l'hypertrophie des cardiomyocytes, il existe également une hyperplasie des cellules endothéliales et les fibroblastes, tandis que la quantité de cardiomyocytes reste constante [569-573]. L'hypertrophie des cardiomyocytes est le résultat de la ré-activation d'un ou plusieurs RRGs du programme transcriptionnel embryonnaire/foétale cardiaque (ré-expression de gènes embryonnaires/foétaux tels que *Nppa* et *Nppb*) ainsi qu'une activation des gènes de la croissance cellulaire, qui s'accompagne irrémédiablement de l'augmentation de la synthèse protéique et du volume des cardiomyocytes. De surcroît, de multiples modulateurs de l'homéostasie cardio-vasculaire sont

sécrétés par les différentes lignées cellulaires cardiaques afin de coordonner le processus hypertrophique. Ces modulateurs incluent les facteurs natriurétiques, l'oxyde nitrique (NO), le système adrénergique, les protéines du cytosquelette, les protéines de la matrice extracellulaire, les cytokines, et de nombreux autres [574]. Seuls les facteurs natriurétiques et l'oxyde nitrique, qui possèdent des propriétés hypotensives cardioprotectrices (anti-hypertrophiques), seront abordés dans cette section.

#### **1.4.3 Fonctions des facteurs natriurétiques *Nppa* et *Nppb* dans l'homéostasie cardiovasculaire**

Peu de temps après la découverte que le cœur sécrète des hormones auriculaires exhibant des propriétés natriurétiques, diurétiques et vasodilatatrices [575], la principale hormone pourvue de ces fonctions osmorégulatrices et hypotensives, le facteur natriurétique auriculaire (en anglais, " ANP " : " *Atrial Natriuretic Peptide* "), fut purifier et séquencer [576-579]. L'isolation de l'ANP puis de deux autres peptides natriurétiques, BNP (" *Brain Natriuretic Peptide* " ou " *B-type Natriuretic Peptide* ") [580] et CNP (" *C-type Natriuretic Peptide* ") [581], ont ainsi mis en évidence que le cœur, hormis sa fonction de pompe, possédait une activité endocrine qui affectait l'homéostasie cardiovasculaire et rénale par l'intermédiaire de la modulation de la pression sanguine, du volume sanguin, et de l'équilibre en électrolytes [582, 583]. Depuis, la découverte de multiples autres hormones et de facteurs paracrines, juxtacrines, et autocrines impliqués dans la cardiogénèse et l'homéostasie cardiovasculaire ont permis de réaliser de nombreuses avancées dans la compréhension de la physiologie et la pathophysiologie cardiaque. Les multiples effets cardioprotecteurs des facteurs natriurétiques expliquent qu'ils demeurent les principales neuro-hormones cardiaques étudiées à ce jour. Hormis leurs activités hypotensive, hypovolumique, et osmorégulatrice qui résultent de leurs fonctions diurétique, natriurétique, et vasodilatatrice, les neuro-hormones NPPA et NPPB détiennent également des fonctions sympatholytique, lusitropique, anti-fibrotique, anti-hypertrophique, ainsi qu'une activité suppressive du système rénine-angiotensine-aldostérone. En outre, le cœur sécrète très rapidement NPPA (ANP ou ANF) et NPPB (BNP) en réponse

à un accroissement du stress des parois myocardiques durant l'hypertrophie cardiaque pathologique. C'est pourquoi, ces deux neuro-hormones sont présentement employées comme des biomarqueurs, car leur dosage permet de diagnostiquer et de pronostiquer le risque d'infarctus du myocarde (communément appelé " crise cardiaque ") chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque. Ces deux peptides sont également utilisés comme des cibles et des agents thérapeutiques (anaritide et carperitide pour l'ANF recombinant, et nesiritide pour la protéine recombinante de BNP) dans le traitement de l'insuffisance cardiaque aiguë et de l'insuffisance cardiaque aiguë décompensée.

Les neuro-hormones NPPA et NPPB exercent leurs effets physiologiques grâce à la liaison aux récepteurs membranaires ubiquitaires NPR-A (NPR1, GC-A) et NPR-B (NPR2, GC-B) couplés à la guanylate cyclase, qui produisent le messager secondaire GMPc (Guanosine MonoPhosphate cyclique) à partir de la GTP (Guanosine TriPhosphate). Le troisième récepteur à guanylate cyclase, NPR-C (NPR3, GC-C), n'assure qu'une fonction de clairance des facteurs natriurétiques du plasma sanguin et du milieu extracellulaire. Le rôle hypotensif de *Nppa* a été révélé par les études chez la souris dans lesquelles l'ablation de *Nppa* ou de NPR-A (GC-A) était réalisée. En effet, les souris *Nppa*<sup>+/-</sup> et *Nppa*<sup>-/-</sup> développent une hypertension artérielle sensible au sel [584], tandis que les souris NPR-A<sup>-/-</sup> (GC-A<sup>-/-</sup>) exhibent une hypertension artérielle insensible au sel, une hypertrophie cardiaque disproportionnée relativement à l'augmentation de la pression sanguine, de la fibrose ventriculaire, et sont partiellement résistante aux médicaments anti-hypertenseurs (hypotenseurs) [585, 586]. Au contraire, la surexpression de *Nppa* chez des souris transgéniques [587] ou par thérapie génique chez des souris hypertensives [588, 589] réduit la pression sanguine systolique. Le rôle hypotensif de *Nppa* est également supporté par l'existence de variations génétiques (SNP rs5068 et rs198358) au niveau du locus de *NPPB/NPPA* qui sont associées à des concentrations plasmatiques plus élevées de peptides natriurétiques contribuant à une réduction de la pression sanguine systolique/diastolique et du risque d'hypertension artérielle chez les humains [590]. D'autres études d'association pangénomique ont également mis en évidence un risque accru d'hypertension artérielle chez les individus porteurs de certaines variations génétiques au niveau

du locus *NPPB/NPPA* [591], du locus de la GC-A [592-594], ou du gène de la corine qui est responsable du clivage de la pro-ANF et la pro-BNP [595].

Hormis leurs propriétés hypotensive, hypovolumique, et osmorégulatrice, qui résultent de leurs fonctions diurétique, natriurétique, et vasodilatatrice, les neuro-hormones NPPA et NPPB semblent également posséder des activités autocrine et paracrine au niveau du myocarde. En effet, GC-A, le récepteur principal de NPPA et NPPB, antagonise le remodelage excessif du myocarde ventriculaire durant l'hypertrophie cardiaque, de manière indépendante de ses effets hypotenseurs [596-598]. La présence d'une hypertrophie pathologique chez les souris *Nppa*<sup>-/-</sup> normotendues démontre également que les effets anti-hypertrophiques de *Nppa* s'exercent de manière indépendante de sa fonction hypotensive [599]. En fait, les fonctions anti-hypertrophiques de *Nppa* [596-598, 600] sont assurés par l'inhibition des effets systémiques (antidiurétique, anti-natriurétique, vasoconstricteur) et trophiques (hypertrophie des cardiomyocytes, prolifération des fibroblastes, fibrose interstitielle cardiaque) du système rénine-angiotensine [601-603]. D'autres études corroborent en effet les fonctions paracrines anti-fibrotiques de *Nppa* [604, 605] et *Nbbp* [606, 607].

En outre, hormis leur expression lors de la cardiogénèse, la ré-expression précoce de *Nppa* et *Nppb* suite à l'initiation de l'hypertrophie cardiaque pathologique caractérise la ré-activation d'un ensemble de RRGs du programme transcriptionnel embryonnaire/fœtale cardiaque [608]. Leurs fonctions cruciales durant la cardiogénèse et l'hypertrophie cardiaque pathologique a de ce fait stimuler l'analyse de leur régulation transcriptionnelle, afin d'identifier les voies de signalisation qui contrôlent les RRGs cardiaques durant le développement ainsi que les états physiologiques et physiopathologiques. Malgré les nombreuses études menées, seuls les promoteurs de *Nppa* et *Nppb* ont été identifiés au sein du locus *Nppb/Nppa*. Plusieurs modules *cis*-régulateurs semblent exister au sein de ces promoteurs. Notamment, au sein du promoteur de *Nppb*, des sites de liaison à l'ADN (AP1, GATA, et MCAT) localisés au niveau de la région proximale contribue significativement à la régulation basale [609] et inductible [610, 611] de *Nppb*, tandis que des éléments *cis*-régulateurs distaux activateurs et répresseurs,

compris dans les -2500 pb, sont requis afin d'atteindre le output transcriptionnel ventriculaire approprié [609, 612], et pour intégrer la grande variété de stimuli mécaniques et neuro-hormonaux qui sont activés durant les conditions patho-et/ou physiologiques [613-615]. *In vivo*, la région -408 pb à +100 pb de *NPPB* module la majorité de l'expression basal et cardiaque-spécifique [614], tandis que la région s'étendant de -1818 pb à +100 pb récapitule le profil d'expression cardiaque et extracardiaque complet de *NPPB* [616]. Toutefois, malgré les multiples fonctions intégratrices des -2500 pb en amont de *Nppb*, cette région promotrice ne renferme pas les séquences *cis*-régulatrices adéquates afin d'induire l'expression de ce gène natriurétique dans certaines conditions pathologiques, suggérant que des éléments *cis*-régulateurs subsidiaires au promoteur proximal sont nécessaires à la régulation transcriptionnelle de *Nppb* [617].

Similairement au promoteur de *Nppb*, le promoteur proximal de *Nppa* (-700 pb) récapitule la majeure partie du profil d'expression spatio-temporel de *Nppa in vivo* [437, 618, 619], et intègre de multiples stimuli hypertrophiques dans des cultures primaires de cardiomyocytes [620-622]. En réalité, le promoteur de *Nppa* est employé depuis trois décennies comme archétype de la régulation cardiaque lors de la cardiogénèse et les cardiopathies, et sert en conséquence à décrypter les voies de signalisation qui contrôlent les RRGs durant ces étapes de transformation cardiaque. Toutefois, les études de transgénèse ont mis en évidence que le promoteur de *Nppa* (-700 pb) ne renfermait pas la totalité des éléments *cis*-régulateurs nécessaires à l'expression de ce gène lors de certains processus de transformation cardiaque, tels que la croissance cardiaque post-natale ou l'hypertrophie cardiaque pathologique [608, 618, 619, 623, 624]. En effet, les éléments *cis*-régulateurs requis pour la régulation précise du gradient ventriculaire radial durant la cardiogénèse, la réduction de l'expression ventriculaire post-natale, et la ré-expression ventriculaire lors de l'hypertrophie pathologique sont inexistantes au sein du promoteur de *Nppa*. Des études de transgénèse suggèrent que le gradient d'expression ventriculaire radial est contrôlé par des modules *cis*-régulateurs additionnels localisés entre -27 et -11 kpb et/ou +5 et +58 kpb relativement au gène *Nppa*, tandis que la régulation transcriptionnelle

embryonnaire/foétale de *Nppa* requiert des enhancers situés entre -141 et -27 kpb en amont de *Nppa* [619].

En revanche, bien que l'expression de *Nppb* soit dissociée de celle de *Nppa* dans certaines conditions, telles que durant l'exposition à des cytokines pro-inflammatoires [625-629], les profils d'expression cardiaques de ces deux gènes natriurétiques se chevauchent durant la cardiogénèse, et leur transcription est généralement co-réglée en réponse à des stimuli hémodynamiques et neuro-hormonaux. Toutefois, l'architecture de leur promoteur est clairement divergente, ce qui suggère que des éléments *cis*-régulateurs subsidiaires encore inconnus régulent probablement leur expression spatio-temporelle. La découverte, dans une étude d'association pangénomique chez l'humain, de SNPs au sein du locus *NPPB/NPPA* associés avec des variations d'expression de ces deux gènes [590] supporte la possibilité d'une régulation transcriptionnelle coordonnée de ces deux gènes par l'intermédiaire d'enhancers communs. Finalement, la transcription coordonnée de ces deux gènes dans le cœur et la conservation de leur organisation en tandem chez la plupart des vertébrés suggèrent que l'expression de *Nppa* et *Nppb* est co-réglée à la manière du locus de la  $\beta$ -globine par l'intermédiaire de modules *cis*-régulateurs analogues aux enhancers de la région de contrôle du locus (en anglais, " LCR " : " *Locus Control Region* ") du locus de la  $\beta$ -globine [630].

#### 1.4.4 Fonctions de l'oxyde nitrique (NO) dans l'homéostasie cardiovasculaire

L'oxyde nitrique (NO ou monoxyde d'azote) est un gaz labile impliqué dans l'homéostasie cardiovasculaire, similairement aux peptides natriurétiques. De surcroît, le NO agit en activant les guanylates cyclases dites solubles (récepteurs cytosoliques du NO), qui sont capables de synthétiser la GMPc, à l'instar des récepteurs membranaires à guanylate cyclase spécifiques aux peptides natriurétiques [631]. Par contre, le NO est principalement libéré par les cellules endothéliales, les macrophages, les thrombocytes, les hépatocytes, ainsi que les neurones, et agit comme antiagrégant plaquettaire, bactéricide, neurotransmetteur, inhibiteur de la prolifération des cellules musculaires lisses, et vasodilatateur via la



myorelaxation des cellules musculaires lisses. La profusion de fonctions assurées par l'oxyde nitrique au niveau d'une variété de lignées cellulaires cardiaques concourt à la régulation de l'homéostasie cardiovasculaire durant des conditions physiologiques et pathologiques. Trois NO synthétases (la NOS neuronale (nNOS ou NOS1), inductible (iNOS ou NOS2), ou endothéliale (eNOS ou NOS3)) sont responsables de la production de NO dans l'organisme. L'importance du NO dans la régulation de l'homéostasie vasculaire et plus particulièrement de la vasodilatation artérielle a été récemment clairement reconfirmée par le déclenchement d'une hypertension artérielle chez les souris qui ont subi une ablation génétique constitutive [632-634] ou conditionnelle (ablation génétique spécifique aux cellules musculaires lisses et inductible à la tamoxifène) [633-635] du gène codant pour la sous-unité  $\beta 1$  des guanylates cyclases solubles sensibles au NO (NO-GC), causant ainsi la totale inhibition de la voie de signalisation au NO/NO-GC/GMPc. En revanche, l'ablation génétique homozygote des trois gènes NOSs chez les souris *n/l/eNos<sup>-/-</sup>* est à l'origine d'anomalies métaboliques telles que l'hypertriglycémie, la dyslipidémie, l'altération de la tolérance au glucose, l'athérosclérose aortique, l'hypertension artérielle [636, 637] et des lésions rénales résultant du développement d'un diabète insipide néphrogénique [638]; l'ensemble de ces anomalies métaboliques sont des facteurs de risques de dysfonctions endothéliales et de ce fait de maladies cardiovasculaires, ce qui explique les infarctus spontanés du myocarde accompagnés de sévères lésions coronariennes artériosclérotiques dans plus de 55% des souris *n/l/eNos<sup>-/-</sup>*, dont la longévité est ultimement réduite [637, 639]. Ces symptômes cardiovasculaires, qui semblent dépendants de la voie de signalisation AT1R, témoignent du rôle crucial du système NOS dans le maintien de l'homéostasie métabolique et cardiovasculaire [633, 634, 637].

Au-delà des actions autocrines et paracrines de NO, illustrées d'une part par l'hyperperméabilisation des cellules endothéliales de la microvascularisation [640] et d'autre part par la myorelaxation des cellules musculaires lisses en réponse à la molécule de NO produite par les cellules endothéliales, une activité endocrine a également été mise en évidence [641]. En effet, malgré la courte demi-vie du NO, la nitrosation de protéines et la formation de métabolites d'oxydation du NO (NOx)

tels que les nitrites et les S-nitrosothiols (RSNO) semblent faciliter le transport des molécules de NO vers des organes ou tissus éloignés pour y générer une réponse physiologique. Cette activité endocrine du NO a d'ailleurs été révélée dans la cytoprotection hépatique chez les souris sur-exprimant *Nos3* spécifiquement dans le myocarde (CS-eNOS-Tg) et dont le foie était soumis à une lésion ischémique; l'élévation cardiaque, hépatique, et plasmatique des niveaux de NOx (nitrites, nitrates, et S-nitrosothiols) et leurs effets bénéfiques dans l'amélioration des lésions hépatiques ischémiques artificiellement induites semblent donc avoir été favorisées par la surproduction de NO dans le myocarde de ces souris CS-eNOS-Tg [641].

Bien que le NO détienne une activité endocrine, la plupart de ses effets physiologiques sont attribués à ses fonctions paracrines ou autocrines. Le décryptage de ces multiples fonctions trophiques locales est permis par l'analyse des souris dont un seul gène NOS a été délété. Par exemple, les souris *Nos3*<sup>-/-</sup> développent une hypertrophie cardiaque pathologique concentrique progressive [642-644] et exhibent des anomalies métaboliques similaires aux souris *nileNos*<sup>-/-</sup> sans toutefois développer d'artérioscléroses coronariennes et d'infarctus spontanés du myocarde, suggérant que la présence des deux autres gènes NOSs compense pour l'absence de *Nos3*; les dysfonctions endothéliales/vasculaires engendrant des lésions vasculaires ainsi que des complications pathogéniques cardiaques apparaissent donc essentiellement lorsque les trois gènes *Nos* sont inactivés [637]. Certaines des lignées de souris *Nos3*<sup>-/-</sup> présentent également des malformations congénitales telles que des malformations pulmonaires qui expliqueraient la létalité accrue des nouveau-nés *Nos3*<sup>-/-</sup> [645], ou des MCCs telles que des CIAs [646] et des valves aortiques bicuspidées [647]. Le développement de MCCs chez les souris *Nos3*<sup>-/-</sup> corrobore le risque accru de MCCs associés au polymorphisme G894T de ce gène chez l'humain [549]. Néanmoins, bien que *Nos3* soit exprimé de façon prépondérante dans les cellules endocardiques durant la cardiogénèse [648] et le cœur adulte, aucune ablation génétique conditionnelle n'a été réalisée durant l'embryogénèse afin d'évaluer l'impact d'une inactivation de *Nos3* dans l'endocarde ou le myocarde. L'expression majoritairement endothéliale/endocardique de *Nos3* suggère donc que l'activité de *Nos3* dans

l'endocarde contribue de manière fondamentale à la morphogénèse des structures cardiaques altérées chez les souris *Nos3<sup>-/-</sup>*.

Hormis les MCCs détectées dans certaines lignées murines *Nos3<sup>-/-</sup>*, le degré d'hypertension artérielle est similaire chez les souris *Nos3<sup>-/-</sup>* et les triple mutants *n/lileNos<sup>-/-</sup>* [638], témoignant du rôle antihypertenseur primordial de *Nos3*. L'hypertension artérielle [649, 650] et l'inaptitude à la vasodilatation artérielle NO-dépendante de l'aorte, des artères carotides, des artères coronaires, à l'exception des artères mésentériques [651], sont parmi les principales conséquences de l'ablation du gène *Nos3*; la vasodilatation subsidiaire des artères mésentériques est a contrario totalement abolie chez les triples mutants *n/lileNos<sup>-/-</sup>* uniquement [652]. Le rôle hypotenseur de *Nos3* est également corroboré par le fait que sa surexpression au niveau des cellules endothéliales engendre une hypotension et une atténuation de la vasorelaxation, sans doute causée par la désensibilisation à toute élévation subsidiaire de la concentration de GMPc, déjà très élevée [653]. Bien que les souris *Nos3<sup>-/-</sup>* ne développent pas d'artérioscléroses coronariennes et d'infarctus spontanés du myocarde, les dysfonctions endothéliales causées par l'ablation génétique de *Nos3* sont susceptibles d'engendrer ou de contribuer à l'émergence d'altérations cardiovasculaires [654-657]. En effet, l'ablation de *Nos3* favorise l'hypertension artérielle [649, 650], l'agrégation plaquettaire [658], l'inflammation [659], le risque d'athérosclérose [660], la résistance à l'insuline [661, 662], l'altération de la biogenèse et de la fonction mitochondriale [663, 664], ainsi que le risque d'embolie et l'exacerbation des infarctus [665, 666]. Les fonctions cardioprotectrices de *Nos3* sont également supportées par les effets bénéfiques de la surexpression endothéliale-spécifique de *Nos3* sur la survie ainsi que sur les fonctions cardiaques et pulmonaires chez des souris atteintes d'insuffisance cardiaque congestive sévères [667, 668]. La surexpression de *Nos3* dans les cellules endothéliales [669] ou les cardiomyocytes [670, 671] protège le cœur en le maintenant dans un état préconditionné ce qui atténue la sévérité des lésions infarctées causées par les événements d'ischémie/reperfusion.

Les multiples fonctions de *Nos3* chez la souris semblent identiques à celles exhibées chez l'humain, étant donné que de nombreuses mutations au niveau du

gène *NOS3* engendrent des altérations analogues à celles répertoriées chez la souris. Ainsi, certains variants polymorphiques du gène *NOS3* chez l'humain, réduisant probablement la biodisponibilité du NO, sont associés à diverses affections pathologiques généralement cardio-vasculaires telles que l'hypertension [672], les maladies des artères coronaires [673-676], les spasmes coronariens [677, 678], l'infarctus myocardique, les maladies rénales terminales, et les néphropathies [679]. Une forte association existe également entre les polymorphismes G894T et 4b/a (insertion-délétion dans l'intron 4) du gène *NOS3* et les individus diabétiques développant des néphropathies sévères [679]. Les polymorphismes au niveau du promoteur (T-786C), qui réduit l'activité du promoteur de plus de 50% [678, 680], et de l'exon 7 (G894T) sont tous deux associés à l'hypertension artérielle et à une atténuation de la vasodilatation artérielle [681, 682]. Le génotype -786 CC au niveau du promoteur de *NOS3* est associé à une résistance aux traitements anti-hypertensifs chez les individus présentant une hypertension artérielle [683]. En outre, le génotype homozygote 896TT est quant à lui associé à une atténuation de la vasodilatation musculaire suite à un exercice musculaire isométrique [684]. Toutefois, au fil des études cliniques, des associations contradictoires ont été révélées entre les polymorphismes de *NOS3* et certains des phénotypes cardiovasculaires. Ces incohérences sont attribuées à des facteurs environnementaux, des interactions génétiques, d'autres gènes indépendants, ou la variabilité des phénotypes cliniques. Notamment, quelques études cliniques ont démontré l'impact de certaines interactions entre les allèles polymorphes de *NOS3* et des facteurs environnementaux, tels que la consommation de cigarettes ou d'acides gras essentiels N-3 (ou oméga-3), dans la modulation des fonctions vasculaires, qui se répercute sur l'expressivité des pathologies cardiovasculaires [685, 686].

### 1.5 Objectif de travail

Au moins sept membres de la famille de facteurs de transcription T-box sont impliqués dans la régulation d'une profusion de processus morphogénétiques durant la cardiogénèse. Certains de ces facteurs opèrent au sein de RRGs communs afin d'une part de contrôler divers mécanismes cellulaires parmi lesquels

la spécification et la détermination de certaines lignées cardiaques, et d'autre part afin de contribuer au " patterning " des champs morphogénétiques cardiogènes, dans le but de coordonner l'agencement des structures le long de l'ébauche cardiaque. L'abondance de leurs fonctions explique que leur mutation ou ablation génétique engendre diverses MCCs. Le décryptage des activités spécifiques de chacun de ces membres requiert donc d'identifier leurs fonctions dans les différentes lignées cardiaques dans lesquelles elles s'expriment au cours de la cardiogénèse. Les diverses MCCs répertoriées dans le SHO suggèrent que les fonctions de *Tbx5*, à l'instar de multiples autres facteurs de transcription cardiaques, dépendent des différents RRGs au sein desquels ce gène opère dans les diverses lignées cardiogéniques. La régulation de l'expression de *Tbx5* et les différentes interactions combinatoires qu'établit ce dernier avec d'autres facteurs de transcription au sein des diverses lignées cardiaques représentent certains des mécanismes moléculaires qui procurent à *Tbx5* un grand nombre de fonctions cellulaires/tissulaires durant la cardiogénèse. Afin de découvrir les fonctions de *Tbx5* durant le développement cardiaque plusieurs objectifs ont donc été poursuivis au cours de ce travail de doctorat. Tout d'abord, étant donné que l'activité d'un gène dépend ordinairement des diverses protéines qui peuvent être synthétisées, un premier objectif était d'identifier les différents transcrits alternatifs de *Tbx5* et d'en déterminer leurs fonctions. Le deuxième objectif de ce présent travail était de spécifier l'implication de *Tbx5* dans la septation cardiaque, et particulièrement d'évaluer les fonctions de *Tbx5* au niveau de l'endocarde dans la morphogénèse du septum inter-auriculaire. Finalement, un dernier objectif était de tenter d'identifier le ou les mécanisme(s) moléculaire(s) par le(s)quel(s) *Tbx5* régule son principal gène cible, *Nppa*, et d'en extraire les informations qui pourraient éclaircir sa fonction transcriptionnelle. Cet objectif nécessitait dans un premier lieu d'identifier les différents modules *cis*-régulateurs coordonnant la régulation transcriptionnelle de *Nppa* et *Nppb*, deux gènes natriurétiques dont l'organisation en tandem et le profil d'expression durant la cardiogénèse sont conservés chez les mammifères.

# **Chapitre 2. Distinct expression and function of alternatively spliced Tbx5 isoforms in cell growth and differentiation. (*Publié*).**

**Running title: Alternative splicing of Tbx5**

**Romain Georges<sup>1,2,†</sup>, Georges Nemer<sup>1,2,†</sup>, Martin Morin<sup>1,2</sup>, Chantal Lefebvre<sup>1</sup>,  
and Mona Nemer<sup>1,2,3,\*</sup>**

<sup>†</sup>Co-first authors

<sup>1</sup>Research Unit in Cardiac Growth and Differentiation, Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, QC, CANADA

<sup>2</sup>Programme de biologie moléculaire, Université de Montréal, Montréal, CANADA

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, University of Ottawa, Ottawa, CANADA

**Keywords:** Tbx5, splicing, heart, GATA-4, transcription

**\*Correspondent footnote:** Dr Mona Nemer

Research Unit in Cardiac Growth and Differentiation  
Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)  
110, avenue des Pins Ouest  
Montréal QC H2W 1R7 CANADA  
Tel: 514-987-5680  
Fax: 514-987-5575

## 2.1 Contributions

**Romain Georges:** J'ai effectué les injections de la tamoxifène dans les souris transgéniques  $\alpha$ MHC-MerCreMer;CAT-*Tbx5* ainsi que les dissections des cœurs embryonnaires et adultes des souris transgéniques et sauvages pour les études d'histologies, d'immunohistologies, et d'immunofluorescences afin d'analyser les phénotypes cardiaques des souris transgéniques et l'expression de marqueurs cardiaques (*Gata4*, *Nkx2.5*, *Tbx5*), hypertrophiques (*Nppa*), musculaires (*MyoD*, *Desmin*), du cycle cellulaire (*Cyclin A*, *Ki-67*), ou d'épitopes (Flag, HA). J'ai également réalisé les " western blot " et les immunofluorescences afin de mesurer l'expression de *Tbx5* dans des cultures primaires de cardiomyocytes, et l'apoptose (Apoptag) au niveau de différentes lignées cellulaires (C2C12, TC13, NIH 3T3) après transfection des différents isoformes de *Tbx5*. Finalement, j'ai mené les expériences de transactivation dans différentes lignées cellulaires (C2C12, TC13, NIH 3T3), les analyses de liaison des deux isoformes de *Tbx5* à différents sites TBEs par " EMSA ", et quelques analyses d'interaction protéine-protéine par " pull-down ". **Mona Nemer**, **Georges Nemer**, et moi avons analysé les résultats et collaboré à l'écriture du manuscrit.

**Georges Nemer** a cloné les isoformes alternatifs long et court de *Tbx5* et mesuré l'expression de ces deux différents isoformes au cours de l'embryogénèse et le développement post-natal par PCR quantitatif.

**Martin Morin** a réalisé les expériences de fractionnement des extraits nucléaires de TC13 et de cœur de souris néonatales et adultes.

**Chantal Lefebvre** a effectué certaines analyses d'interaction protéine-protéine par " pull-down ", des transfections, et des " western blot ".

Ce manuscrit a été publié dans *Molecular and Cellular Biology*. Juin 2008. Vol. **28**(12): pages 4052-4067. (0270-7306/08/\$08.00+0, doi:10.1128/MCB.02100-07, Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved) [687].

## 2.2 Abstract

Mutations in the T-box transcription factor *TBX5* cause Holt-Oram syndrome, an autosomal dominant disease characterized by a wide spectrum of cardiac and upper limb defects with variable expressivity. *Tbx5* haploinsufficiency has been suggested as the underlying mechanism and experimental models are consistent with a dosage sensitive requirement for *Tbx5* in heart development. Here we report that *Tbx5* levels are regulated through alternative splicing that generates, in addition to the known 518 amino acid protein, a C-terminal truncated isoform. This shorter isoform retains the capacity to bind DNA but its interaction with *TBX5* collaborators such as GATA-4 is altered. *In vivo*, the two spliced isoforms are oppositely regulated in a temporal and growth factor dependent manner and are present in distinct DNA-binding complexes. Expression of the long isoform correlates with growth stimulation and its reexpression in postnatal transgenic mice hearts promotes hypertrophy. Conversely, upregulation of the short but not long isoform in C2C12 myoblasts leads to growth arrest and cell death. The results provide novel insight into post-transcriptional *Tbx5* regulation and point to an important role not only in cell differentiation but also in cell proliferation and organ growth. The data may help analyze genotype-phenotype relations in Holt-Oram patients.



## 2.3 Introduction

The T-box transcription factor *Tbx5* is a dosage sensitive regulator of heart and limb development (28). In human, mutations in the *TBX5* gene cause Holt-Oram syndrome, an autosomal dominant disorder characterized by a wide spectrum of malformations of the upper limbs and the heart (4,23). Cardiac defects range from asymptomatic alterations in the conduction system to septal or more complex structural defects. This variable expressivity is observed even within families and suggests the existence of genetic and/or environmental modifiers. To date, over 50 different mutations in the *TBX5* locus have been identified in Holt-Oram patients (17). Because many mutations lie within the coding region and result in a truncated or no protein, it has been proposed that *TBX5* haploinsufficiency may be the mechanism underlying Holt-Oram pathogenesis. Consistent with this hypothesis, mice heterozygous for a deleted *Tbx5* allele display upper limb and cardiac malformations similar to what is observed in Holt-Oram patients (6). As in humans, the severity of the defects is influenced by the genetic background and variable expressivity even in a given mouse strain was noted.

It is well established that *Tbx5* is a potent DNA-binding transcriptional activator. *TBX5* binds, through its T-box domain, specific DNA motifs termed TBEs (T-box binding elements) resulting in the activation of target genes such as *Nppa*, the gene encoding the cardiac atrial natriuretic factor (ANF) (6). *TBX5* also cooperates with other transcription factors, notably *NKX2.5* and *GATA-4*, leading to synergistic regulation of downstream targets (6,12,18). *TBX5* nuclear localization requires two sequences, one within the N-terminal of the T-box and the other outside the T-box in the C-terminal part of the protein (7,38). Using Gal-*TBX5* chimeras, an activation domain was localized within the C-terminal region of h*TBX5* adjacent to the nuclear localization signal (38). Whether this is the sole or major activation domain in the context of the native *TBX5* protein remains to be determined.

While many of the identified *TBX5* mutations are predicted to alter protein production, a large number of point mutations that lead to single amino acid substitutions or in frame mutations have also been reported. Biochemical analysis

has shown that some mutations within the T-box domain of TBX5 lead to alterations in subcellular localization, DNA binding or transcriptional activation (10,14). Other missense mutations within the T-box as well as some just outside the T-box have been suggested to disrupt functional interaction with NKX2.5 or GATA-4 (10,12,14). Thus, the functionally impaired mutant proteins may represent a state of haploinsufficiency. Intriguingly, these mutations, which alter interactions with cardiac regulators, do not preferentially associate with cardiac versus limb defects and the correlation between genotype and phenotype remains unclear. Better understanding of *Tbx5* regulation and mechanisms of action are required to enhance our insight into the mechanism(s) of pathogenesis.

In addition to mutations in the coding sequences, mutations in intragenic regions have been identified in Holt-Oram patients (10,17). Furthermore, it has been suggested that unscreened mutations within introns or regulatory sequences of the *Tbx5* locus may account for the relatively low (35%) detection rate in familial as well as sporadic cases of Holt-Oram syndrome (5). Such mutations could affect RNA splicing resulting in the production of less protein or altered splice isoforms. Examination of the human *TBX5* locus suggests indeed the possible existence of splice variants resulting – in at least one case – in the production of a C-terminal truncated protein at AA350 (Refseq.: NM\_080718.1). The existence of a shorter hTBX5 isoform was also reported by Basson et al (4).

Alternative splicing resulting in distinct protein isoforms has been reported for other T-box proteins, notably the other cardiac family member *Tbx20* (37) and *Tbx3* (3), the gene mutated in ulnar-mammary syndrome. Analysis of the *Tbx3* isoforms revealed that alternative splicing may be tissue-specific and may account for distinctive organ effects (11). Alternative splicing at the *Tbx20* locus can result in several C-terminal truncated or modified isoforms. However, the temporal and spatial expression of these isoforms as well as their function remains to be elucidated.

In this paper, we report the isolation and biochemical characterization of a novel *Tbx5* isoform resulting from the usage of an alternate exon 8 that produces a C-terminal frame shift leading to the production of a shorter protein. We provide

evidence that the two *Tbx5* isoforms have distinct biochemical properties and are produced in a growth factor regulated manner. Thus, *Tbx5* dosage may be developmentally regulated through the generation of functionally distinct isoforms. The existence of alternatively spliced *Tbx5* isoforms provides new insight for understanding the pathogenesis of Holt-Oram syndrome.

## 2.4 Material and methods

**Plasmids.** Both isoforms of mouse *Tbx5* were amplified by RT-PCR using the same oligonucleotides harboring the start codon (forward) and stop codon (reverse). They were subcloned XbaI/BamHI into the pCGN vector in phase with the HA epitope. N- and C-terminal deletions of *Tbx5* were generated in the same vector using PCR-mediated mutagenesis. The same *Tbx5* inserts were also cloned into the pcDNA vector to produce *in vitro* transcribed/translated proteins. MBP-*Tbx5* constructs were prepared as previously described (22). The ANF-luciferase, constructs as well as the *Gata4* expression vectors were previously described (6,9,22). All constructs were confirmed by sequence.

**RT-PCR.** The oligonucleotides used for the amplification of both *Tbx5* isoforms are: 5' CAAACTCACCAACAACCACC 3' (f) and 5' GCCAGAGACACCATTCTCAC 3' (r). RT-PCR was carried out as previously described (31).

**Generation of TBX5 antibody.** Recombinant MBP-TBX5 was generated by cloning the region encoding the first 53 amino acids of murine TBX5 into the Maltose Binding Protein vector (MBP) as previously described (9). The recombinant protein was injected into New Zealand rabbits and the produced antibody was purified as previously described (32). In addition to TBX5, the following primary antibodies were used in the study:  $\alpha$ -HA (Santa Cruz, cat sc-805),  $\alpha$ -HA (Roche, clone 12CA5),  $\alpha$ -MyoD (BD Pharmingen, cat 554130),  $\alpha$ -MF-20 (Developmental Studies Hybridoma Bank, MF20),  $\alpha$ -Desmin (Accurate Chemical & Scientific Corp. cat BYA60851),  $\alpha$ -FlagM2 and  $\alpha$ -FlagM5 (Sigma, cat F3165 and F4042, respectively),  $\alpha$ - $\alpha$ Tubulin (Santa Cruz, cat sc-32293) and TBX2 (Upstate, 07-318). The secondary antibodies used were biotinylated anti-goat, anti-rabbit or anti-mouse (Vector Laboratories, cat. BA-5000, BA-1000, BA-2000), and S-11225, A-11029, T-3605 from Molecular Probes.

**Cell culture and transfections.** Primary cardiomyocytes, NIH3T3 and C2C12 cells were maintained in culture and transfected as described previously (2,32). For immunocytochemistry, 30 000 cells per well were plated in 12 well dishes and

transfected with 1  $\mu$ g of expression vector. 48 h after transfection, cells were washed twice with PBS and then fixed at room temperature for 15 minutes with a 4% paraformaldehyde solution or methanol 100%. Lipofectamine (Gibco) was used for C2C12 transfection as recommended by the manufacturer. For cotransfection assays, the amount of the luciferase reporters was kept constant in all studies by addition of the appropriate empty DNA vector. The experiments were repeated at least 3 times in duplicate and with different DNA preparation.

**Immunofluorescence.** Cells were incubated overnight with the primary antibodies in PBS, 0.2% Tween supplemented with 5% BSA. The TBX5 antibody was used at a dilution of 1/250. Cells were washed 3 times with PBS containing 0.2% Tween, and then incubated with secondary antibodies (Vector Laboratories cat BA-1000, BA-2000) at a dilution of 1/250 for 1 h at room temperature. After three washes in PBS, 0.2 % Tween, fixed cells were then incubated for 45 minutes at room temperature with a Streptavidin-AlexaFluor546 conjugate (Molecular Probes cat S-11225) and the Fluorescein  $\alpha$ -rabbit conjugate (Vector Laboratories cat FI-1000) at a dilution of 1/500. TUNEL assays were conducted using the Apoptag kit (Intergen, Purchase, NY). An average of 20 random fields were counted. Ki67 (clone SP6, Thermo Scientific Medicorp, RM9106-S1) and cyclin A (sc596 Santa Cruz) antibodies were used at a dilution of 1/100 for immunohistochemistry.

**Recombinant protein production and *in vitro* protein-protein interactions.** *In vitro* protein-protein interactions were carried out using MBP fusion proteins for the long and short isoforms and *in vitro* translated  $^{35}$ S labelled proteins in rabbit reticulocyte lysates using the T7 RNA polymerase of the TNT system (PromegaCorp, Madison, WI). Binding reactions and visualisation were carried out as described in Durocher et al (9). Western Blots were carried out according to our previously published procedures using nuclear or whole cell extracts (2).

**Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs).** Nuclear or whole cell extracts from cultured cardiomyocytes or 293T cells over-expressing Tbx5a or Tbx5b were used. Binding reactions were carried out at room temperature in the

presence of 1 µg of poly dl/dC. The brachyury (Bra) and ANF, TBE2 probes used for binding assays were described previously (6).

**Transgenic mice.** To overexpress the long *Tbx5* isoform specifically in the heart, mouse *Tbx5a* cDNA was subcloned in the CAG-CAT expression vector (a kind gift of Dr M. Yanagisawa, Howard Hughes Medical Institute, Dallas TX) in which expression of *Tbx5a* is activated only after Cre-mediated recombination (20). Transgenic mice expressing CAG-CAT-*Tbx5a* were generated, genotyped and bred according to standard procedures. These mice were crossed with transgenic mice expressing a tamoxifen-inducible cre-recombinase in the myocardium (33). Adult double transgenic mice were treated with tamoxifen as described by Petrich et al (33). Genotyping was carried out using PCR and standard protocols. For immunohistochemistry, hearts were processed as previously described (2).

## 2.5 Results

**Growth factor regulated generation of alternatively spliced *Tbx5* isoforms.** We used RT-PCR to isolate cDNA clones containing the entire *Tbx5* open reading frame from adult mouse heart. Amplified DNA was subcloned and 20 independent clones were fully sequenced. Of those, five corresponded to the expected sequence that encodes the 518 AA protein referred to as *Tbx5a* (Fig. 1A). The other 15 clones contained a 40 bp insertion at the 3' border of the T-box coding region; this results in the addition of four new residues after amino acid 251 and a stop codon thus generating a C-terminal truncated TBX5 protein, TBX5b (Fig. 1A/B). Sequence analysis of the genomic *Tbx5* locus revealed that the insertion likely corresponds to an alternatively spliced exon 8. The fact that 75% of the isolated cDNA clones correspond to this splice isoform suggest that it may be the prevalent TBX5 protein present in the adult heart. The presence of this novel transcript in *Tbx5* expressing cells was confirmed using sequence specific RT-PCR-mediated amplification. As shown in Figure 1C, this alternate splice isoform was detected in RNA from limb, P19 cells, cardiac cells (progenitor TC13 cells and atrial HL1 cells) and myoblast C2C12 cell lines.

To assess the distribution of the two *Tbx5* transcripts, we designed a pair of oligonucleotides corresponding to sequences in exons 7 and 9 which are common to both isoforms. The primers allow the simultaneous detection of *Tbx5a* (423 bp) and *Tbx5b* (463 bp) transcripts. As shown in Figure 1D, both transcripts were detected in total RNA from embryonic hearts and limbs as well as in the adult heart. Interestingly, the ratio of the two transcripts was temporally regulated as *Tbx5a* abundance decreased while *Tbx5b* increased with development. Consistent with the cloning results, *Tbx5b* was the predominant isoform in the adult heart. We also analyzed *Tbx5* expression in proliferating (myoblasts) and differentiated (myotubes) C2C12 cells (Fig. 1D, right panel). Similar to the developing heart, *Tbx5b* transcripts were more abundant in differentiated myotubes. These results confirm the presence of alternatively spliced *Tbx5* transcripts in heart and limbs and suggest a positive correlation between *Tbx5b* and terminal differentiation on the one hand and *Tbx5a* and cell proliferation on the other.

Next, we analyzed the TBX5 proteins produced from the isolated *Tbx5* cDNAs using Western blots. For this, *Tbx5a* and *5b* sequences were subcloned in expression vectors to generate HA-tagged proteins. We also generated and characterized an anti-TBX5 antibody that targets the first 60 AA and allows detection of endogenous TBX5 proteins. As shown in Figure 2A, a full length TBX5 protein of ~64 kDa was found in cells expressing HA-TBX5a while a smaller ~35 kDa protein was present in cells transfected with HA-*Tbx5b* expression vectors. Both proteins were detected using the HA antibody (lower panel) as well as the TBX5-specific antibody (top panel). The anti-TBX5 antibody was specific and did not recognize other Tbx proteins such as TBX2, TBX4 and TBX20. We used this antibody to assess the subcellular localization of the two TBX5 isoforms using immunocytochemistry. While the full length TBX5 isoform was localized exclusively to the nucleus, the shorter isoform was found in both the nucleus and the cytoplasm (Fig. 2B). This result was consistently observed in several different cell types including cardiac (TC13 and cardiomyocytes, Fig. 2B, 3D), skeletal muscle (C2C12 cells, Fig. 9) and NIH 3T3 fibroblasts (Fig. 4B). The broader subcellular distribution of TBX5b is consistent with the reported presence of a nuclear retention signal between AA325-340 which is missing in TBX5b (7). The anti-TBX5 antibody was also used to detect endogenous TBX5 using immunohistochemistry on sectioned mouse embryos. At e13.75, immunoreactive TBX5 was detected exclusively in the heart and forelimbs (Fig. 2C and data not shown) consistent with the distribution pattern of *Tbx5* transcripts (6); within the heart, TBX5 positive cells were mostly found in the atria and the trabeculae of the left ventricles, a distribution that perfectly matches that of *Tbx5* transcripts.

Having confirmed the specificity of the anti-TBX5 antibody, we next used it to analyze the profile of TBX5 proteins in cardiac cells. We previously showed that the cardiogenic progenitor TC13 cell line expresses TBX5 as well as GATA-4 and other cardiac markers (31). We used this cell line to obtain native nuclear extracts and analyze TBX5 proteins therein. To enrich for DNA binding proteins, nuclear extracts were purified using ion exchange chromatography on a phosphocellulose column. Three fractions were obtained using a step gradient of 100, 300 or 700 mM KCl and containing non-chromatin binding proteins (100 mM) or proteins



moderately (300 mM) or tightly (700 mM) bound to chromatin. Proteins in the 300 and 700 mM KCl fractions were then size fractionated under non-denaturing conditions using a gel filtration superose 6 column. Western blot analysis using the anti-TBX5 antibody revealed the presence of both TBX5a (~80 KD) and TBX5b (~35 KD) in the 300 mM KCl fraction (Fig. 3A, top panel). The 700 mM fraction contained several TBX5a immunoreactive bands between 64 and 80 KD (Fig. 3A, bottom panel). Our preliminary analysis suggests that these represent post-translationally modified TBX5a (Morin and Nemer, unpublished results). Bioinformatic analysis of TBX5 indicates numerous potential phosphorylations as well as two potential sumoylations. Both TBX5a and TBX5b were also detected in nuclear extracts from other TBX5-expressing cells including C2C12 cells, neonate cardiomyocytes cultures and postnatal hearts (Fig. 3B and Fig. 7). Total nuclear extracts from atrial as well as from ventricular cardiomyocytes contained an additional band around 50 KD, which comigrates with TBX5<sub>1-350</sub> and may represent a cleavage product of TBX5 or possibly another Tbx5 isoform. Interestingly, TBX5a protein was markedly upregulated in atrial cardiomyocytes treated with 15% fetal calf serum (Fig. 3B, bottom panel). Gel shift analysis using whole cell cardiomyocyte extracts and a probe corresponding to the high affinity TBE of the ANF promoter were consistent with the prevalence of TBX5a in atria vs. ventricles and its inducibility by serum (Fig. 3C). As previously reported (6), this 18 bp probe specifically interacts with TBX5 (see Fig. 5). Figure 3C shows that the DNA-binding complexes corresponding to TBX5a binding are increased in cardiomyocytes treated with serum while TBX5b containing complexes are decreased.

The subcellular localization of TBX5 in cardiomyocytes treated or not with serum was analyzed (Fig. 3D). First, HA-tagged TBX5a and TBX5b were transfected in cardiomyocytes and their cellular localization determined using the anti-HA antibody. Consistent with the localization of the two isoforms in all cell types analyzed (Fig. 2B and Fig. 4B), we found that TBX5a is exclusively nuclear even in the absence of serum, while TBX5b is both nuclear and cytoplasmic even in presence of serum (Fig. 3D, bottom panels). In contrast, in the absence of serum, endogenous TBX5 immunoreactivity was found both in the nucleus and the cytoplasm of desmin positive cells while in the presence of serum, TBX5

immunoreactivity was exclusively nuclear. These results likely reflect changes in TBX5a/TBX5b ratios following serum treatment (as suggested in Fig. 3B 3C above). Together, the findings support the likelihood that *Tbx5* splicing is regulated in a growth-dependent manner.

**Alternatively spliced *Tbx5* isoforms have distinct transcriptional activities.** In order to assess the biochemical properties of the TBX5 isoforms described above, we carried out a structure-function analysis of TBX5. Mutant proteins were produced that lacked the N-terminal 52 AA or harbored various C-terminal deletions. It was noted that, except for the isoforms lacking the first 52 AA, which were systematically expressed at lower levels, all other mutant proteins were expressed at similar levels (Fig. 4A). Deletion of the N-terminal domain did not alter nuclear localization but deletion of AA350-300 resulted in both nuclear and cytoplasmic localization (Fig. 4B). The finding that TBX5 mutants lacking AA300-350 are not exclusively nuclear is consistent with the reported presence of a nuclear localization signal between AA325-340 of human TBX5 (7). The transcriptional activities of these constructs were assessed using the TBX5 target promoter ANF. Figure 4C shows that deletion of the last 118 AA (TBX5<sub>1-400</sub>) led to a significant drop in promoter activation indicating the loss of a transactivation domain (TAD). A further decrease in transcriptional activity was observed when AA300-255 were removed. Deletion of the N-terminal domain did not significantly decrease promoter activation but caused a right shift in the dose response curve likely reflecting the lower level of protein accumulation. Together, these results suggest the presence of three important functional domains in TBX5, in addition to the T-box, one in the N-terminal likely involved in protein stabilization and two TADs within the C-terminal domain between AA400-518 and between AA250-300, both C-terminal TADs being absent in the shorter *Tbx5b* splice isoform.

The inability of TBX5b to activate the ANF promoter extended to cardiomyocytes (Fig. 5A). However, increased TBX5b levels did not inhibit ANF promoter activity in cardiomyocytes, indicating that this isoform is not acting in a dominant negative manner on the ANF promoter as may have been expected. We directly tested whether TBX5b antagonizes TBX5a transcriptional activity. When

increasing doses of *Tbx5b* were cotransfected with *Tbx5a*, no inhibition of promoter activation was observed in any cell type (Fig. 5B and data not shown). Instead, a small but consistent enhancement of *Tbx5a* was observed with increasing amounts of *Tbx5b*, either reflecting titration of an inhibitor or formation of more active TBX5a/TBX5b complexes. Gel shift analyses were carried out to assess the ability of TBX5b to bind DNA in presence or absence of TBX5a, using as probe the ANF TBE as well as the palindromic brachyury site. TBX5b retained the ability to bind both sequences albeit at a lower affinity than TBX5a and, as a result, did not interfere with TBX5a binding (Fig. 5C). Moreover, while TBX5a binds DNA as a dimer no TBX5a/TBX5b dimers were evident; rather, addition of TBX5a decreased TBX5b binding. Together, the results suggest that TBX5b has either a reduced affinity for DNA or that TBX5a-DNA complexes are more stable. Either way, the C-terminal domain of TBX5 appears to contribute to DNA binding.

In the heart, TBX5a can modulate target gene transcription in a DNA-binding independent manner via association with other DNA-binding transcription factors, like NKX2.5 and GATA-4 (6,12,18). The observation that increased levels of TBX5b did not affect ANF promoter activity in cardiomyocytes raised the possibility that TBX5b may be compromised in its ability to physically or functionally interact with coactivators. To address this hypothesis, we directly tested the ability of TBX5b to physically and functionally interact with GATA-4, an essential regulator of ANF and a known TBX5 collaborator. Although TBX5 and GATA-4 were shown to physically associate and cooperate in ANF promoter activation (12), little is known regarding the domains of GATA-4 or TBX5 required for interaction. First, we tested whether GATA-4 TADs were required for synergy with TBX5. GATA-4 contains two TADs in its N- and C-terminal regions (26). Removal of the first 96 AA of GATA-4 dramatically decreased its transcriptional activation of the ANF promoter but did not interfere with its ability to synergize with TBX5 (Fig. 6A). Similarly, removal of the entire C-terminal domain, which severely impairs GATA-4 transcriptional activity, did not affect synergy, nor did deletion of the entire N-terminal and the first zinc finger. Point mutations within the first zinc finger that abolish [V217G; (8)] or not [E215D; (30)] GATA-4 interaction with FOG2 had no effect on GATA-4 association with TBX5 (data not shown). However, removal of both activation

domains as well as a mutation within the basic domain, which abolishes DNA binding, abrogated synergy (Fig. 6A). We conclude that one GATA-4 TAD is sufficient to support synergy and that residues in the basic region C-terminal to the second zinc finger are essential for functional TBX5 interaction. GATA-4 mutants were then tested for their ability to physically associate with TBX5 (Fig. 6B). Pull-down assays revealed that C273G, which disrupts the second zinc finger and DNA binding as well as K299A/H301L, greatly reduce TBX5 interaction (Fig. 6B, compare the intensity of lane 2 to that of lanes 7 and 8). Removal of either or both activation domains of GATA-4 did not affect physical association with TBX5 (lanes 3, 4, 5). A GATA-4 fragment containing the second but not the first zinc finger retained the ability to interact with TBX5 (lane 9). We conclude that GATA-4 contacts TBX5 mainly through its second zinc finger and residues just downstream within its basic region.

Next, we tested the domains of TBX5 required for GATA-4 enhancement of ANF promoter activation. As shown in Figure 6C, removal of the N-terminal of TBX5 decreased synergy with GATA-4 but removal of the last 218 AA which removes the major TAD (Fig. 4) had little effect on GATA-4 synergy. However, neither TBX5b nor TBX5<sub>1-255</sub> were able to cooperate with GATA-4 in ANF promoter activation suggesting that AA255-300 which contain the second TAD is required for GATA-4 cooperativity (Fig. 6C) on the ANF promoter. Surprisingly, TBX5b retained the ability to enhance GATA-4 activation of a GATA-dependent promoter suggesting that TBX5b can act as a transcriptional activator and a collaborator of GATA-4 on a subset of TBX5 targets (Fig. 6C). Pull-down studies confirmed that TBX5b retains a weak but consistent ability to physically contact GATA-4 but that optimal physical interaction with GATA-4 requires sequences outside the T-box that are absent in TBX5b resulting in reduced GATA-4 affinity (Fig. 6E).

In contrast, no functional interaction could be observed between TBX5b and NKX2.5 over the ANF or connexin 40 promoters (Fig. 6D and data not shown). Pull-down studies indicated that, unlike TBX5a, TBX5b could not be retained on a MBP-NKX2.5 resin and no NKX2.5 proteins could be retained on a MBP-TBX5b column (Fig. 6F and data not shown).

The above biochemical analysis together with the finding that TBX5a and TBX5b are present in distinct DNA-binding protein complexes (Fig. 3A) suggest that the two isoforms may have differential downstream targets and regulate distinct cellular processes. The results also indicate that the ANF promoter is a TBX5a but not TBX5b target.

To verify the chromatographic profile of TBX5a and TBX5b during postnatal heart development, nuclear extracts were prepared from neonate and adult hearts. The enriched DNA-binding fraction (elution at 300 or 700 mM KCl over the phosphocellulose IE column) was size separated using gel filtration. In neonate extracts, TBX5a was the predominant isoform in the 300 mM fraction and the only detected isoform in the 700 mM fraction (Fig. 7A and data not shown). Interestingly, TBX5a and GATA-4 coeluted in the same fractions (Fig. 7A). In adult hearts, TBX5b was abundantly present in the 700 and the 300 mM fractions (Fig. 7B and data not shown) and was mostly present in very high molecular weight complexes. Western blots also revealed coelution of Nkx2.5 with the 70 KD TBX5a isoform and the presence of GATA-4 in fractions containing TBX5a (70 and 80 KD form) as well as TBX5b (Fig. 7B). This elution profile is consistent with the *in vitro* analysis detailed above and in line with the possibility that the two TBX5 isoforms participate in distinct cellular pathways. Moreover, the higher abundance of TBX5b relative to TBX5a in the adult heart, contrasted with the higher abundance of TBX5a vs. TBX5b in the neonate heart and in proliferating TC13 cardiogenic progenitors (Fig. 3A) and C2C12 myoblasts (data not shown) and is consistent with data in Figures 1D and 3B, all of which showing positive correlation between TBX5a and cell proliferation and TBX5b and cell differentiation.

**Effect of altering *Tbx5a* ratios.** Given the distinct properties of *Tbx5a* and *Tbx5b* as well as their differential temporal expression during development and in response to growth factors, we tested the consequences of altering their distribution. Since in postnatal ventricles, *Tbx5b* is the predominant isoform, we decided to assess the effect of *Tbx5a* reexpression. For this, we generated CAG-CAT-*Tbx5a* transgenic mice in which *Tbx5a* expression is activated only after Cre-mediated recombination. To induce *Tbx5a* expression in the adult heart, we

crossed this line with a tamoxifen-inducible  $\alpha$ MHC-driven Cre transgenic line. Adult double transgenics were treated with tamoxifen for one week and analyzed. As shown in Figure 8, this treatment resulted in expression of *Tbx5a* in the ventricles (Fig. 8 top panels) as well as upregulation of ANF (Fig. 8 lower panels). Interestingly, reexpression of *Tbx5a* in adult ventricles led to cardiac hypertrophy as evidenced in Figure 9. *Tbx5a* overexpressing hearts were visibly larger than their controls (Fig. 9A). Histological analysis revealed that this is likely due to myocyte hypertrophy (Fig. 9B, left panel). Immunohistochemical analysis of proliferation markers including cyclin A and Ki67 found no detectable evidence of increased proliferation in the *Tbx5a* transgenic hearts (Fig. 9B, middle and right panels). Given that hypertrophy is the response of terminally differentiated cardiomyocytes, these data are consistent with a growth promoting role of *Tbx5a* that is reminiscent of that of GATA-4 (24). Thus, in addition to its role in atrial specification, *Tbx5a* may regulate myocyte growth.

We also analyzed the effect of altering *Tbx5a/Tbx5b* ratio in C2C12 myoblasts. As stated earlier, *Tbx5a* is the predominant isoform in proliferating myoblasts. Therefore we tested the effect of overexpressing *Tbx5b* therein. As shown in Figure 10A and B, transient transfection of *Tbx5b* consistently resulted in marked cell death and very few *Tbx5b* positive cells (Fig. 10A top panel). Cell morphology was also consistently altered with many cells appearing either elongated or condensed. This was not the case when either *Tbx5a* or *Gata4* were similarly transfected in C2C12 myoblasts (Fig. 10A, bottom panel and data not shown). TUNEL assays were carried out to assess whether *Tbx5b* altered cell survival. As shown in Figure 10B and C, cells transiently expressing *Tbx5b* had a 3-fold increase in the rate of apoptosis whereas cells expressing *Tbx5a* had a similar low level of apoptosis as cells that did not express the transgene.

These observations suggest that increased *Tbx5b* may cause growth arrest, a result consistent with *Tbx5b* prevalence in terminally differentiated myocytes. Together the data is consistent with the notion that *Tbx5* isoforms have distinct biochemical and functional properties and that *Tbx5* function may be regulated at the splicing level. The results also point to a role for *Tbx5* in cell growth.

## 2.6 Discussion

It is now well established that *Tbx5*, the gene mutated in Holt-Oram syndrome, is a dosage sensitive regulator of heart and limb development. However, little is known regarding the modulation of *Tbx5* levels and activity. In the present work, we provide evidence for *Tbx5* regulation through alternative splicing that generates, in temporally specific and growth factor-dependent manner, two isoforms with distinct biochemical properties. Regulated production of alternatively spliced *Tbx5* isoforms provides a new paradigm that may help to elucidate the variable expressivity and genotype-phenotype relation in Holt-Oram patients.

**Functional *Tbx5* domains and regulation of *Tbx5* levels and activity.** *Tbx5* has been shown to bind to target promoters and activate transcription alone or in collaboration with other transcriptional regulators, such as NKX2.5 (6) or GATA-4 (12). In the present work, we found that, in addition to an intact T-box, sequences C-terminal of the T-box that are present in only one of the TBX5 isoforms contribute to physical association with GATA-4 and NKX2.5. Decreased TBX5b affinity for GATA-4 affects its ability to potentiate GATA-4 activation of the ANF promoter but not that of a GATA-dependent BNP promoter. These results raise the possibility that TBX5b, which lacks the entire C-terminal domain, may retain the ability to activate transcription of a subgroup of *Tbx5* target genes.

Previous studies indicated that the C-terminal of TBX5 harbors transcriptional activation domain(s). Using Gal-chimeras, Plageman et al (34) reported that AA266-515 of mouse TBX5 contain a potent transcriptional activation domain (TAD). Others using a similar Gal4-TBX5 fusion in a modified yeast one hybrid system reported that an autonomous TAD resides between AA339-379 (38). In the present work, we tested the ability of various TBX5 C-terminal deletion mutants to activate a *Tbx5* target promoter. Our results indicate that the C-terminal domain of TBX5 is required within the context of the native protein for transcriptional activation. Additionally, we found two discrete domains within the C-terminal that contribute to activation. The first is located between AA400-518 and the second between AA255-300, which was not previously described. Our results do not exclude the possibility for additional TADs, such as the one reported between

AA339-379 that may function cooperatively with downstream domains in the context of the native TBX5 protein.

The C-terminal domain of TBX5 was shown to interact with transcriptional coactivators such as WW domain proteins whose presence enhances TBX5 activity (29). In this case, functional interaction is abrogated when AA317-518 are deleted. In the future, it will be interesting to test whether either TAD identified in the present work is involved in this interaction. The C-terminal domain of TBX5 was also shown to associate with the Lim protein LMP-4 leading to decreased nuclear TBX5 levels and relocalization to the cytoskeleton (21). While the exact TBX5 domain involved in this interaction has not been mapped, it is noteworthy that in our study, deletion of the last 178 AA did not alter subcellular distribution. Whether this reflects interaction of LMP-4 with AA239-350 will be worth testing. In this respect, our results showed that deletion of AA300-350 causes nuclear-cytoplasmic redistribution of TBX5 consistent with the reported presence of a nuclear localization signal between AA325-340 (7). Thus, nuclear TBX5 levels and activity can be regulated post-transcriptionally through protein-protein interactions, many of which target the TBX5 C-terminal domain.

The data presented provide, for the first time, information on endogenous Tbx5 proteins. Other than the expected 70 and 35 KD band comigrating with TBX5a and TBX5b, other immunoreactive bands were detected in TBX5-expressing cells suggesting extensive post-translational modifications. *In silico* analyses of TBX5 reveals the existence of numerous phosphorylation sites, mostly in the C-terminal as well as consensus motifs for other modifications (including sumoylation), which would produce higher MW isoforms. Remarkably, the elution profile suggests that these modifications may alter protein:protein interactions as evidenced by the fact that the different isoforms are present in distinct DNA-binding fractions.

Finally, our study reveals a new mechanism for regulating TBX5 expression and activity that involves alternative splicing of the *Tbx5* gene to produce two isoforms with distinct temporal distribution and activity. The novel isoform, TBX5b, lacks the entire C-terminal domain but retains the ability to bind DNA. Altered DNA binding profile may provide a possible mechanism to explain why an isoform



lacking TADs does not act as an inhibitor of the full length TBX5 protein. Indeed, we found that TBX5b formed predominantly monomeric complexes with DNA that were displaced by TBX5a leading exclusively to TBX5a homodimeric complexes. No TBX5a/b heterodimers could be detected by gel shift. In pull down experiments, TBX5a was efficiently retained on a GST-TBX5a but not on a GST-TBX5b column (data not shown). These results suggest that sequences C-terminal of the T-box are involved in optimal TBX5-DNA interaction possibly through dimer formation. A previous report also suggested that residues outside the T-box affect TBX5 binding to an artificial palindromic site in a complex manner; for example, TBX5<sub>51-237</sub> bound DNA though largely as monomer but addition of 4 AA (TBX5<sub>51-241</sub>) abrogated DNA interaction (14). Consistent with this, the elution profile of endogenous TBX5 proteins in cardiac cells showed that high affinity TBX5b interaction with chromatin occurs in the context of a large DNA-binding complex (Fig. 7). Together, these results indicate that the C-terminal domain of TBX5 contributes to high affinity DNA binding and influences complex formation.

**Expression and effects of *Tbx5* isoforms in cell growth and differentiation.** In addition to their distinct biochemical properties, the expression pattern of *Tbx5* isoforms suggested differential role in cellular proliferation. Both *in vivo* and in cultured cells, expression of *Tbx5a* correlated with proliferative growth while *Tbx5b* was predominant in more differentiated, less proliferative cells. Thus, the ratio of *Tbx5b/Tbx5a* in the heart increased during embryonic development and, by e13.5 *Tbx5b* was by far the predominant isoform. By this stage, heart morphogenesis is near completion and, importantly, myocyte proliferation is tempering down. In cultured postnatal myocytes, it is possible to reverse this ratio by growth factor stimulation (Fig. 3). Interestingly, *Tbx5a* was predominant in neonate hearts but *Tbx5b/Tbx5a* ratio increased in adult hearts suggesting that *Tbx5a* may also be involved in postnatal hypertrophic growth. Reexpression of *Tbx5a* in adult hearts using spatial and temporal inducible transgenic lines led to cardiac hypertrophy (Fig. 9) consistent with a causative link between *Tbx5a* and cardiomyocyte growth. A similar growth factor dependent distribution of the two isoforms is observed in C2C12 myoblasts where *Tbx5a* is dominant in proliferating myoblasts while *Tbx5b* is present at a higher level in differentiated myotubes (Fig.

1B). Misexpression of *Tbx5b* but not *Tbx5a* in proliferating C2C12 caused growth arrest and apoptosis (Fig. 10). Further analysis of the role of *Tbx5b* in cell survival and/or cell cycle arrest will require the generation of inducible *Tbx5b* expressing transfectants.

In addition to its role in cellular differentiation, accumulating evidence support a role for *Tbx5* in cell growth regulation. For example, several studies have suggested a role for *Tbx5* in limb outgrowth, in part through *Fgf10* expression rather than a role in limb specification or identity (1,27,36). *Tbx5* has also been implicated in forelimb regeneration (19). At the level of the heart, gain of *Tbx5a* function in transgenic chick or mouse hearts was shown to result in growth retardation and hypotrabeulation (16,25). Although Hatcher et al suggested that their results demonstrate that *Tbx5a* is a negative regulator of proliferation, the phenotype may well reflect loss of ventricular specification as shown by Liberatore et al. Loss of *Tbx5* function in knockout mice did not support a negative role for *Tbx5a* in growth regulation (6). More recently, it was shown that *Tbx5* depletion in *Xenopus* decreases cardiac cell numbers and interferes with cell cycle progression (15). Our results are consistent with a growth promoting effect of *Tbx5a* in the heart as well as in C2C12 myoblasts where persistent expression of *Tbx5a* promoted proliferation even in the absence of serum (data not shown). On going experiments are aimed at identifying *Tbx5a* targets in cell growth.

### **Regulation of *Tbx5* splicing and implications for Holt-Oram syndrome.**

Understanding genotype-phenotype relations remains a major clinical challenge for patients with Holt-Oram syndrome due in part to variable intrafamily expressivity and the large spectrum of mutations. Some of these mutations lie in the C-terminal coding region, and would solely affect the *Tbx5a* isoform. Based on our results, it is intriguing to speculate that, in such patients, only a subset of *Tbx5* target genes and processes may be disrupted resulting in milder phenotypes. The *heartstrings* mutation in zebrafish which is due to a mutation in *Tbx5* that leads to formation of a C-terminally truncated protein (TBX5<sub>1-316</sub>) causes a less severe cardiac and limb phenotype than null *Tbx5* mutation (13) and is consistent with our hypothesis. Moreover, in a recent study, gain of *Tbx5* function in cultured cardiogenic cells

revealed that an equivalent human mutant (R297er) alters the ability of *Tbx5a* to induce some but not all target genes (35).

Finally, our results point to new sequences within the *Tbx5* locus in which mutations may associate with Holt-Oram syndrome or other congenital cardiac and/or limb defects. Regulated splicing at the *Tbx5* gene would alter the level of *Tbx5a* and/or the ratio of the two isoforms thus impacting total *Tbx5* levels. Considering the exquisite *Tbx5* dosage sensitivity, we propose that regulation of *Tbx5* splicing may provide a paradigm that helps explain variable expressivity of a given TBX5 mutation within families as well as genetic background dependent severity of defects resulting from *Tbx5* haploinsufficiency.

## 2.7 Acknowledgements

We thank Lynda Robitaille for expert technical assistance in the initial stages of this work, Caroline Doyon for the preparation of the CAG-CAT-*Tbx5a* targeting vector, Lise Laroche for secretarial help, Pierre Paradis for help with animal studies, Annie Vallée for histology, and the staff of the IRCM transgenic core. We are indebted to Jeff Molkentin for generously providing the Mer-Cre-Mer transgenic mouse line.

## 2.8 Sources of funding

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research. R.G. was a recipient of a studentship from the Heart and Stroke Foundation of Canada, and M.N. is a Canada Research Chair in Molecular Biology.

**Reprints and permissions** information is available at

<http://journals.asm.org/misc/reprints.dtl>

## 2.9 References

1. Agarwal, P., J. N. Wylie, J. Galceran, O. Arkhitko, C. Li, C. Deng, R. Grosschedl, and B. G. Bruneau. 2003. Tbx5 is essential for forelimb bud initiation following patterning of the limb field in the mouse embryo. *Development* 130:623-633.
2. Aries, A., P. Paradis, C. Lefebvre, R. J. Schwartz, and M. Nemer. 2004. Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 101:6975-6980.
3. Bamshad, M., T. Le, W. S. Watkins, M. E. Dixon, B. E. Kramer, A. D. Roeder, J. C. Carey, S. Root, A. Schinzel, L. Van Maldergem, R. J. Gardner, R. C. Lin, C. E. Seidman, J. G. Seidman, R. Wallerstein, E. Moran, R. Sutphen, C. E. Campbell, and L. B. Jorde. 1999. The spectrum of mutations in TBX3: Genotype/Phenotype relationship in ulnar-mammary syndrome. *Am.J.Hum.Genet.* 64:1550-1562.
4. Basson, C. T., D. R. Bachinsky, R. C. Lin, T. Levi, J. A. Elkins, J. Soultis, D. Grayzel, E. Kroumpouzou, T. A. Traill, J. Leblanc-Straceski, B. Renault, R. Kucherlapati, J. G. Seidman, and C. E. Seidman. 1997. Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat.Genet.* 15:30-35.
5. Borozdin, W., A. M. Bravo Ferrer Acosta, M. J. Bamshad, E. M. Botzenhart, U. G. Froster, J. Lemke, A. Schinzel, S. Spranger, J. McGaughan, D. Wand, K. H. Chrzanowska, and J. Kohlhase. 2006. Expanding the spectrum of TBX5 mutations in Holt-Oram syndrome: detection of two intragenic deletions by quantitative real time PCR, and report of eight novel point mutations. *Hum.Mutat.* 27:975-976.
6. Bruneau, B. G., G. Nemer, Schmitt, J.P., F. Charron, L. Robitaille, S. Caron, D. A. Conner, M. Gessler, M. Nemer, C. E. Seidman, and J. G. Seidman. 2001. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* 106:709-721.

7. Collavoli, A., C. J. Hatcher, J. He, D. Okin, R. Deo, and C. T. Basson. 2003. TBX5 nuclear localization is mediated by dual cooperative intramolecular signals. *J.Mol.Cell.Cardiol.* 35:1191-1195.
8. Crispino, J. D., M. B. Lodish, B. L. Thurberg, S. H. Litovsky, T. Collins, J. D. Molkentin, and S. H. Orkin. 2001. Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors. *Genes Dev.* 15:839-844.
9. Durocher, D., F. Charron, R. Warren, R. J. Schwartz, and M. Nemer. 1997. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J.* 16:5687-5696.
10. Fan, C., M. Liu, and Q. Wang. 2003. Functional analysis of TBX5 missense mutations associated with Holt-Oram syndrome. *J.Biol.Chem.* 278:8780-8785.
11. Fan, W., X. Huang, C. Chen, J. Gray, and T. Huang. 2004. TBX3 and its isoform TBX3+2a are functionally distinctive in inhibition of senescence and are overexpressed in a subset of breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 64:5132-5139.
12. Garg, V., I. S. Kathiriya, R. Barnes, M. K. Schluterman, I. N. King, C. A. Butler, C. R. Rothrock, R. S. Eapen, K. Hirayama-Yamada, K. Joo, R. Matsuoka, J. C. Cohen, and D. Srivastava. 2003. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* 424:443-447.
13. Garrity, D. M., S. Childs, and M. C. Fishman. 2002. The heartstrings mutation in zebrafish causes heart/fin Tbx5 deficiency syndrome. *Development* 129:4635-4645.
14. Ghosh, T. K., E. A. Packham, A. J. Bonser, T. E. Robinson, S. J. Cross, and J. D. Brook. 2001. Characterization of the TBX5 binding site and analysis of mutations that cause Holt-Oram syndrome. *Hum.Mol.Genet.* 10:1983-1994.
15. Goetz, S. C., D. D. Brown, and F. L. Conlon. 2006. TBX5 is required for embryonic cardiac cell cycle progression. *Development* 133:2575-2584.

16. Hatcher, C. J., M. S. Kim, C. S. Mah, M. M. Goldstein, B. Wong, T. Mikawa, and C. T. Basson. 2001. TBX5 transcription factor regulates cell proliferation during cardiogenesis. *Dev.Biol.* 230:177-188.
17. Heinritz, W., L. Shou, A. Moschik, and U. G. Froster. 2005. The human TBX5 gene mutation database. *Hum.Mutat.* 26:397.
18. Hiroi, Y., S. Kudoh, K. Monzen, Y. Ikeda, Y. Yazaki, R. Nagai, and I. Komuro. 2001. Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat.Genet.* 28:276-280.
19. Khan, P., B. Linkhart, and H. G. Simon. 2002. Different regulation of T-box genes Tbx4 and Tbx5 during limb development and limb regeneration. *Dev.Biol.* 250:383-392.
20. Kisanuki, Y. Y., R. E. Hammer, J. Miyazaki, S. C. Williams, J. A. Richardson, and M. Yanagisawa. 2001. Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev Biol* 230:230-242.
21. Krause, A., W. Zacharias, T. Camarata, B. Linkhart, E. Law, A. Lischke, E. Miljan, and H. G. Simon. 2004. Tbx5 and Tbx4 transcription factors interact with a new chicken PDZ-LIM protein in limb and heart development. *Dev.Biol.* 273:106-120.
22. Lavallée, G., G. Andelfinger, M. Nadeau, C. Lefebvre, G. Nemer, M. Horb, and M. Nemer. 2006. The Kruppel-like transcription factor KLF13 is a GATA-4 collaborator for heart development. *EMBO J* 25:5201-5213.
23. Li, Q. Y., R. A. Newbury-Ecob, J. A. Terrett, D. I. Wilson, A. R. Curtis, C. H. Yi, T. Gebuhr, P. J. Bullen, S. C. Robson, T. Strachan, D. Bonnet, S. Lyonnet, I. D. Young, J. A. Raeburn, A. J. Buckler, D. J. Law, and J. D. Brook. 1997. Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat.Genet.* 15:21-29.
24. Liang, Q., L. J. De Windt, S. A. Witt, T. R. Kimball, B. E. Markham, and J. D. Molkentin. 2001. The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate



cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo. *J.Biol.Chem.* 276:30245-30253.

25. Liberatore, C. M., R. D. Searcy-Schrick, and K. E. Yutzey. 2000. Ventricular expression of *tbx5* inhibits normal heart chamber development. *Dev.Biol.* 223:169-180.
26. McBride, K., F. Charron, C. Lefebvre, and M. Nemer. 2003. Interaction with GATA transcription factors provides a mechanism for cell-specific effects of c-Fos. *Oncogene* 22:8403-8412.
27. Minguillon, C., J. Del Buono, and M. P. Logan. 2005. *Tbx5* and *Tbx4* are not sufficient to determine limb-specific morphologies but have common roles in initiating limb outgrowth. *Dev.Cell* 8:75-84.
28. Mori, A. D., Y. Zhu, I. Vahora, B. Nieman, K. Koshiba-Takeuchi, L. Davidson, A. Pizard, J. G. Seidman, C. E. Seidman, X. J. Chen, R. M. Henkelman, and B. G. Bruneau. 2006. *Tbx5*-dependent rheostatic control of cardiac gene expression and morphogenesis. *Dev.Biol.* 297:566-586.
29. Murakami, M., M. Nakagawa, E. N. Olson, and O. Nakagawa. 2005. A WW domain protein TAZ is a critical coactivator for TBX5, a transcription factor implicated in Holt-Oram syndrome. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 102:18034-18039.
30. Nemer, G., F. Fadlalah, J. Usta, M. Nemer, G. Dbaibo, M. Obeid, and F. Bitar. 2006. A novel mutation in the *GATA4* gene in patients with tetralogy of Fallot. *Hum.Mutat.* 27:293-294.
31. Nemer, G. and M. Nemer. 2002. Cooperative interaction between GATA-5 and NF-ATc regulates endothelial-endocardial differentiation of cardiogenic cells. *Development* 129:4045-4055.
32. Nemer, G. and M. Nemer. 2003. Transcriptional activation of BMP-4 and regulation of mammalian organogenesis by GATA-4 and -6. *Dev.Biol.* 254:131-148.

33. Petrich, B. G., J. D. Molkentin, and Y. Wang. 2003. Temporal activation of c-Jun N-terminal kinase in adult transgenic heart via cre-loxP-mediated DNA recombination. *FASEB J.* 17:749-751.
34. Plageman, T. F., Jr. and K. E. Yutzey. 2004. Differential expression and function of Tbx5 and Tbx20 in cardiac development. *J.Biol.Chem.* 279:19026-19034.
35. Plageman, T. F., Jr. and K. E. Yutzey. 2006. Microarray analysis of Tbx5-induced genes expressed in the developing heart. *Dev Dyn.* 235:2868-2880.
36. Rallis, C., B. G. Bruneau, J. Del Buono, C. E. Seidman, J. G. Seidman, S. Nissim, C. J. Tabin, and M. P. Logan. 2003. Tbx5 is required for forelimb bud formation and continued outgrowth. *Development* 130:2741-2751.
37. Stennard, F. A., M. W. Costa, D. A. Elliott, S. Rankin, S. J. Haast, D. Lai, L. P. McDonald, K. Niederreither, P. Dolle, B. G. Bruneau, A. M. Zorn, and R. P. Harvey. 2003. Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2-5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart. *Dev.Biol.* 262:206-224.
38. Zaragoza, M. V., L. E. Lewis, G. Sun, E. Wang, L. Li, I. Said-Salman, L. Feucht, and T. Huang. 2004. Identification of the TBX5 transactivating domain and the nuclear localization signal. *Gene* 330:9-18.

## 2.10 Figure legends

**Figure 2.1. Schematic representation of the *Tbx5* isoforms and their distribution during embryonic heart development.** (A) Sequence of the additional exon 7b with the 5' and 3' splice sites upstream and downstream of this exon. The consensus splice sites are also shown. (B) Schematic representation of the *Tbx5* locus. Alternate splicing that includes the additional exon 7b results in the insertion of four additional amino-acids (RPLL) and a stop codon a few amino-acids downstream of the T-box domain. The position and length (bp) of each exon is depicted by the black boxes. (C) RT-PCR carried out using a primer specific to the additional exon 7b in different cells and tissues [FL: Forelimbs, HL1: atrial cells, P19: embryonic cardiomyocyte non-differentiated (ND), differentiated into cardiomyocytes with DMSO (D) and TC13: cardiac progenitors]. The control (Ctrl) is the plasmid containing the cDNA of the short *Tbx5* splice isoform. The position of the primers in exons 7b and 8 is shown. (D) RT-PCR distribution of *Tbx5* transcripts during embryonic heart and limb development and C2C12 cell differentiation. The position of the primers used in exon 7 and 9 is shown by arrows in Fig. C. Embryonic stages are indicated. (Ad: Adult, H: Heart, L: limb, Mb: myoblasts, Mt: myotubes, Tub:  $\alpha$ -Tubulin).

**Figure 2.2. Characterization of the anti-TBX5 antibody.** (A) Schematic representation of TBX5a with the epitope region used to produce an anti-TBX5 antibody. Below are western blots, containing nuclear extracts from 293T cells over-expressing T-box factors, incubated with the indicated antibodies to confirm the specificity of the anti-TBX5 antibody.  $\alpha$ - $\alpha$ Tubulin is used as a loading control. (B) Immunofluorescence analysis of HA-TBX5a and HA-TBX5b subcellular localization. Note how TBX5a is nuclear while TBX5b is both nuclear and cytoplasmic. (C) Immunohistochemical staining of mouse embryo tissue sections with anti-TBX5 antibody. Note the absence of TBX5 immunoreactivity in the right ventricle (RV) and its presence in left and right atria (LA, RA) and left ventricle (LV). EC, endocardial cushion; AS, atrial septum; MV mitral valve; TV tricuspid valve.

**Figure 2.3. Endogenous TBX5 expression in cardiac cells.** (A and B) Western blot analysis of TBX5 in fractionated nuclear extracts from TC13 cardiac progenitors (A) and in total nuclear extracts from atrial and ventricular cardiomyocyte cultures (B) and from atrial cardiomyocytes treated or not with fetal bovine serum (B, lower panel). The position of the long and short isoforms is indicated by closed or open arrows, respectively. (C) DNA binding profile of endogenous TBX5 in total atrial and ventricular cardiomyocyte extracts. Binding of Oct1 is used as a loading control. (D) Confocal microscopy analysis of TBX5 subcellular localization in cardiomyocytes treated or not with FBS. To-Pro3 stains the nuclei and desmin antibody the cardiomyocytes. Note the nuclear redistribution of endogenous TBX5 in cells treated with serum. The lower panel shows the localization of transfected HA-tagged TBX5a/5b in cardiomyocytes.

**Figure 2.4. Structure-function analysis of TBX5.** (A) Western blot analysis showing expression of the various N- or C-terminal deleted, HA-tagged TBX5 recombinant proteins. Note how removal of the first 51 AA consistently results in markedly reduced protein levels. (B) Immunofluorescent localization of various HA-tagged TBX5 proteins transfected into NIH3T3 cells using the anti-HA antibody. Except for TBX5<sub>1-300</sub> and TBX5b which have broad cellular distribution, all other mutants tested are exclusively nuclear. (C) Structure-function analysis of TBX5 activation of the ANF promoter. Transient co-transfections were carried out in NIH3T3 cells using the indicated *Tbx5* expression vectors and the ANF-luc-reporter. The results shown are the mean of four different experiments carried out in duplicate.

**Figure 2.5. Differential ability of the two *Tbx5* isoforms to bind DNA and activate transcription.** (A and B) Comparison of *Tbx5a* and *Tbx5b* ability to activate the ANF promoter alone or in combination in cardiac (A) and non-cardiac (B) cells. The results shown are the mean  $\pm$  SD of 4 independent determinations. (C and D) Interaction of TBX5 isoforms with the ANF TBE (C) and the Brachyury palindromic site (D). EMSAs were performed using nuclear extracts from 293T cells overexpressing HA-TBX5a or Flag-TBX5b. Supershifts/blocking were

performed with the  $\alpha$ -HA (clone 12CA5) or  $\alpha$ -Flag M5. Note how the  $\alpha$ -Flag blocks binding of Flag-TBX5b to the TBE whereas  $\alpha$ -HA produces a supershift.

**Figure 2.6. Mapping the physical and functional interaction domains of GATA-4 and TBX5.** (A) Transfections in NIH3T3 of various GATA-4 mutants with TBX5. MutZn2 is a point mutation in the second zinc finger of GATA-4 (C273G) that abolishes DNA binding; K299A/H301L also abolishes DNA binding. (B) GATA-4 contacts TBX5 through its second zinc finger domain. Pull-down assays were performed using MBP-TBX5a and *in vitro* produced  $^{35}$ S-labeled GATA-4 proteins (DM = K299A/H301L), Luciferase (Luc) and GATA-6. (C) Functional interaction with GATA-4 requires N- and C-terminal domains of TBX5 and is promoter context dependent. Transfections were carried out in NIH3T3 cells using the indicated reporters. Note how TBX5b is able to differentially activate the 2 promoters. The results are shown as fold enhancement of GATA-4 transcriptional activity. (D) Cotransfections of the ANF-luc reporter with *Nkx2.5* and *Tbx5a/5b*. Note how TBX5b is unable to support NKX2.5 synergy. The results are the mean  $\pm$  SD of  $n=4$ . (E and F) Pull-down assays using different MBP fusion proteins and *in vitro* translated  $^{35}$ S-labeled full length GATA-4 (E) or wild-type and mutant NKX2.5 proteins (F). Note how TBX5b has greatly reduced affinity for GATA-4 and its inability to interact with NKX2.5.

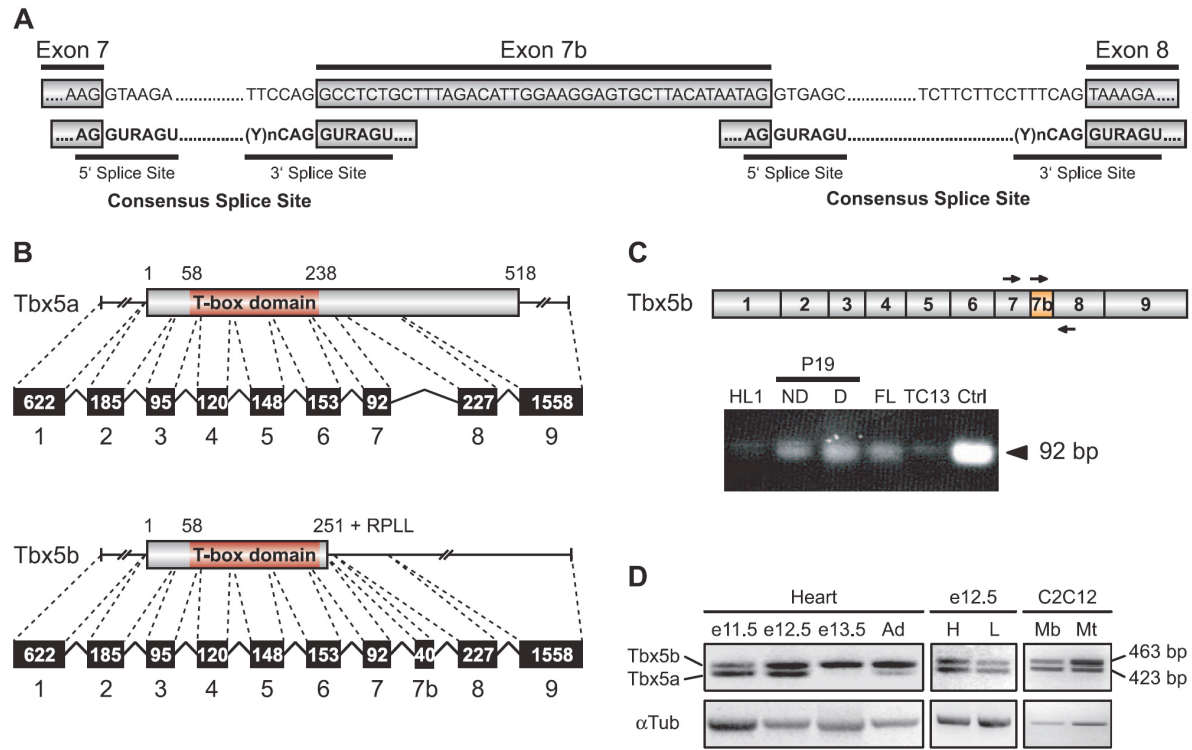
**Figure 2.7. Elution profile of endogenous TBX5, NKX2.5 and GATA-4.** Nuclear extracts from neonate (A) or one-month-old (B) mouse hearts were enriched for DNA-binding proteins by elution at 700 mM KCl over phosphocellulose column. Western blots of this fraction following gel filtration are shown. Note how TBX5a and TBX5b are present in distinct protein complexes.

**Figure 2.8. Immunohistochemical analysis of heart sections from adult transgenic mice ectopically expressing (right panels) or not (left panels) TBX5a.** The top panels show staining with the anti-TBX5 antibody while the lower panels show ANF immunoreactivity.

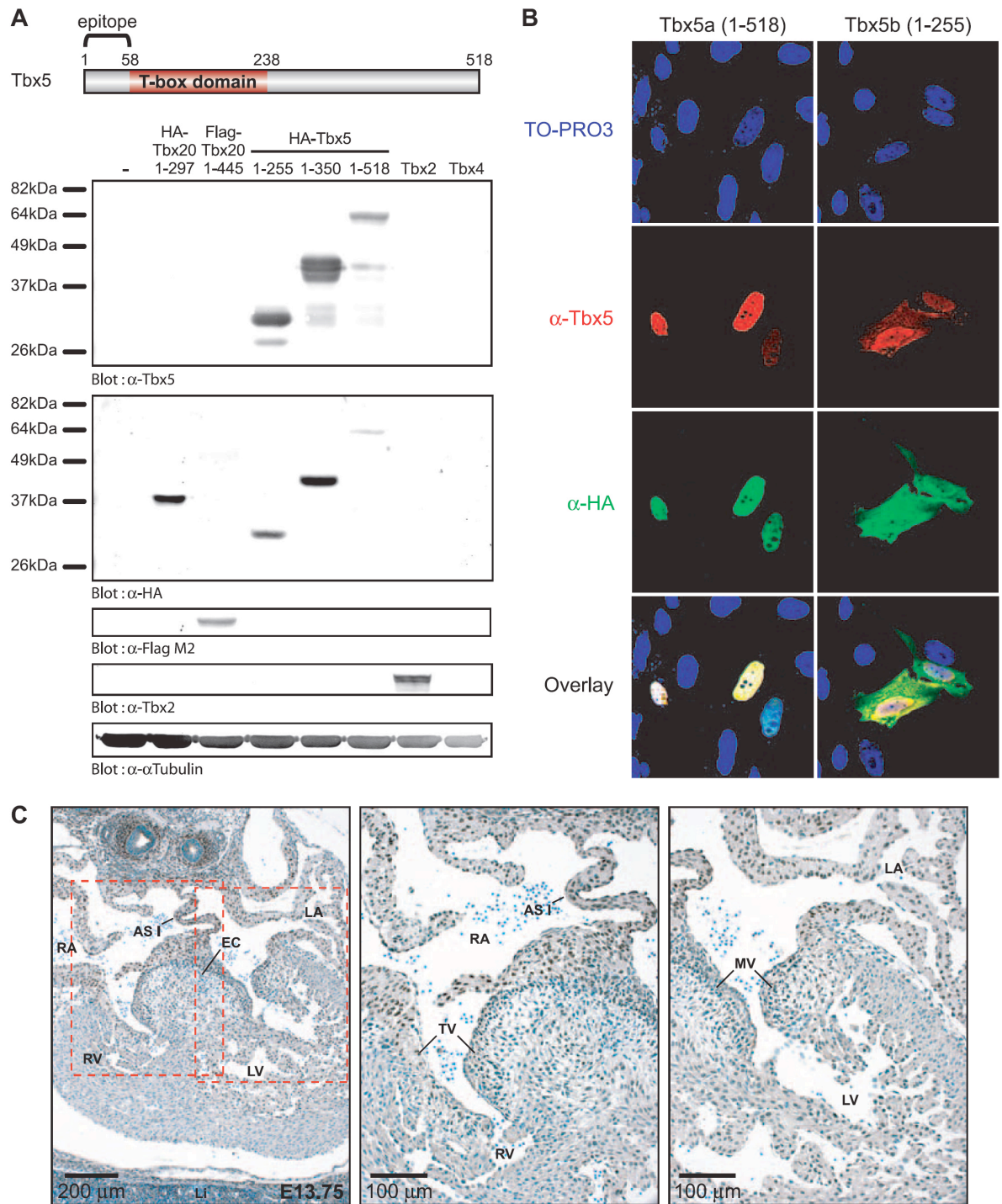
**Figure 2.9. Reexpression of *Tbx5a* in adult hearts leads to cardiomyocyte hypertrophy.** (A) Gross morphology of freshly dissected hearts from control and

*Tbx5a* overexpressing hearts. Note how tamoxifen-induced expression of *Tbx5a* is associated with cardiac enlargement. The hearts shown are representative of two separate experiments, each carried out with n=4 in each group. **(B)** Analysis of heart sections from vehicle ((top) and tamoxifen (bottom) treated transgenic mice. The left panels represent Masson-trichrome staining. Note the enlarged size of the myocytes. The middle and right panels show immunohistochemical labeling with proliferation markers, Ki67 and cyclin A, respectively. No change is detected following *Tbx5a* reexpression in the adult heart.

**Figure 2.10. Differential effects of transient transfection of *Tbx5* isoforms in C2C12 myoblasts.** **(A)** Transient expression of HA-tagged TBX5 proteins in C2C12 myoblasts in presence of serum. TBX5 expressing nuclei are in red. The fewer number of TBX5b positive cells was consistently obtained in over 10 different experiments carried out by three independent experimentators. Note also altered morphology of *Tbx5b* but not *Tbx5a* transfected cells. MyoD staining is used as control. **(B)** TBX5b increases cell apoptosis. TUNEL assays were carried out on C2C12 cells transiently transfected with Flag-tagged *Tbx5a* or *Tbx5b* vector. Cells expressing the transgenes are labeled in red (with anti-TBX5) and yellow (with anti-flag) and apoptotic nuclei in green. **(C)** Quantitative analysis of apoptosis, the data shown are expressed as the ratio of TUNEL-positive cells in transfected vs. non-transfected cells in the same Petri dish. The results are from two transfections and represent the mean of at least 10 different fields.

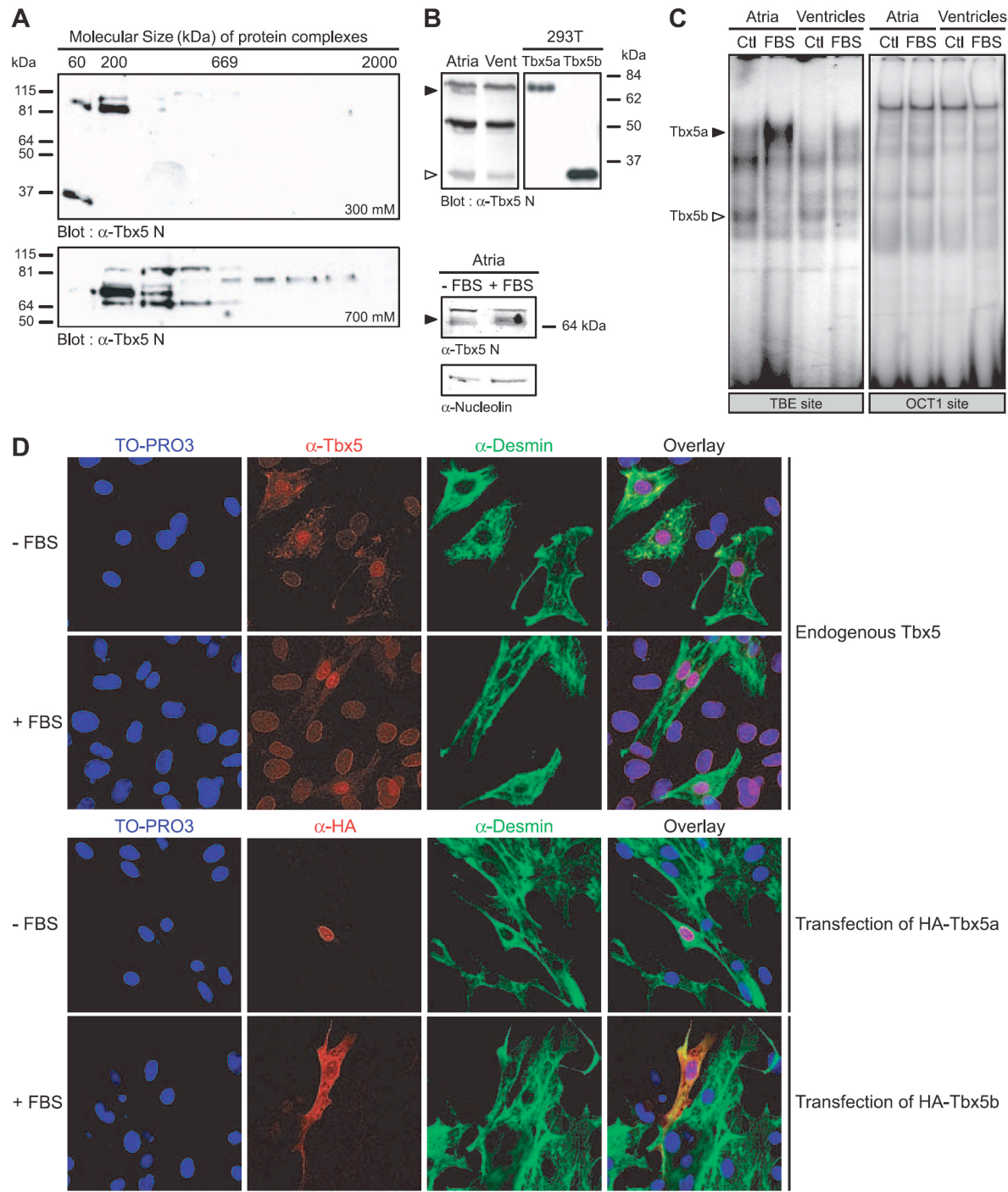


**Figure 2.1. Schematic representation of the *Tbx5* isoforms and their distribution during embryonic heart development.**

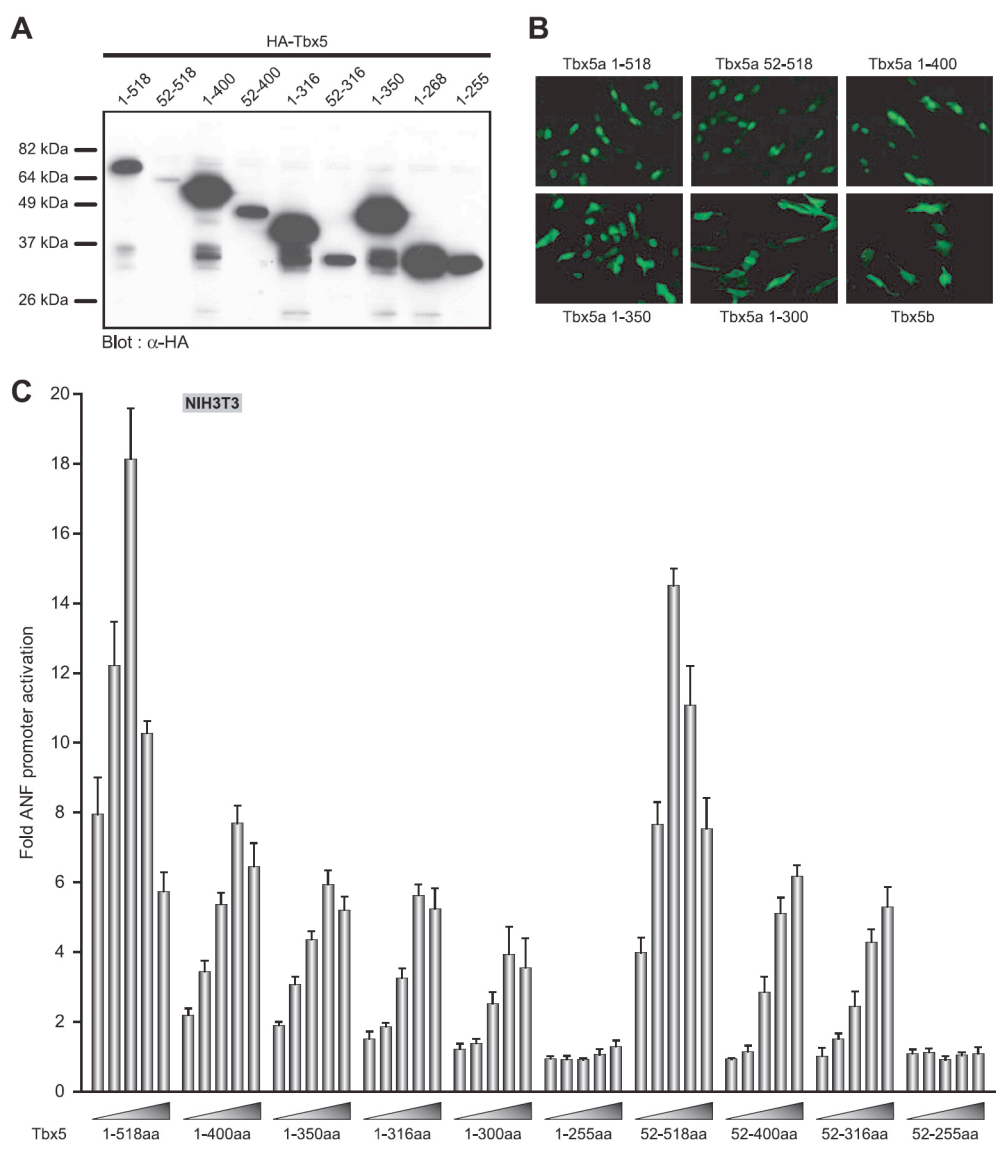


**Figure 2.2. Characterization of the anti-TBX5 antibody.**



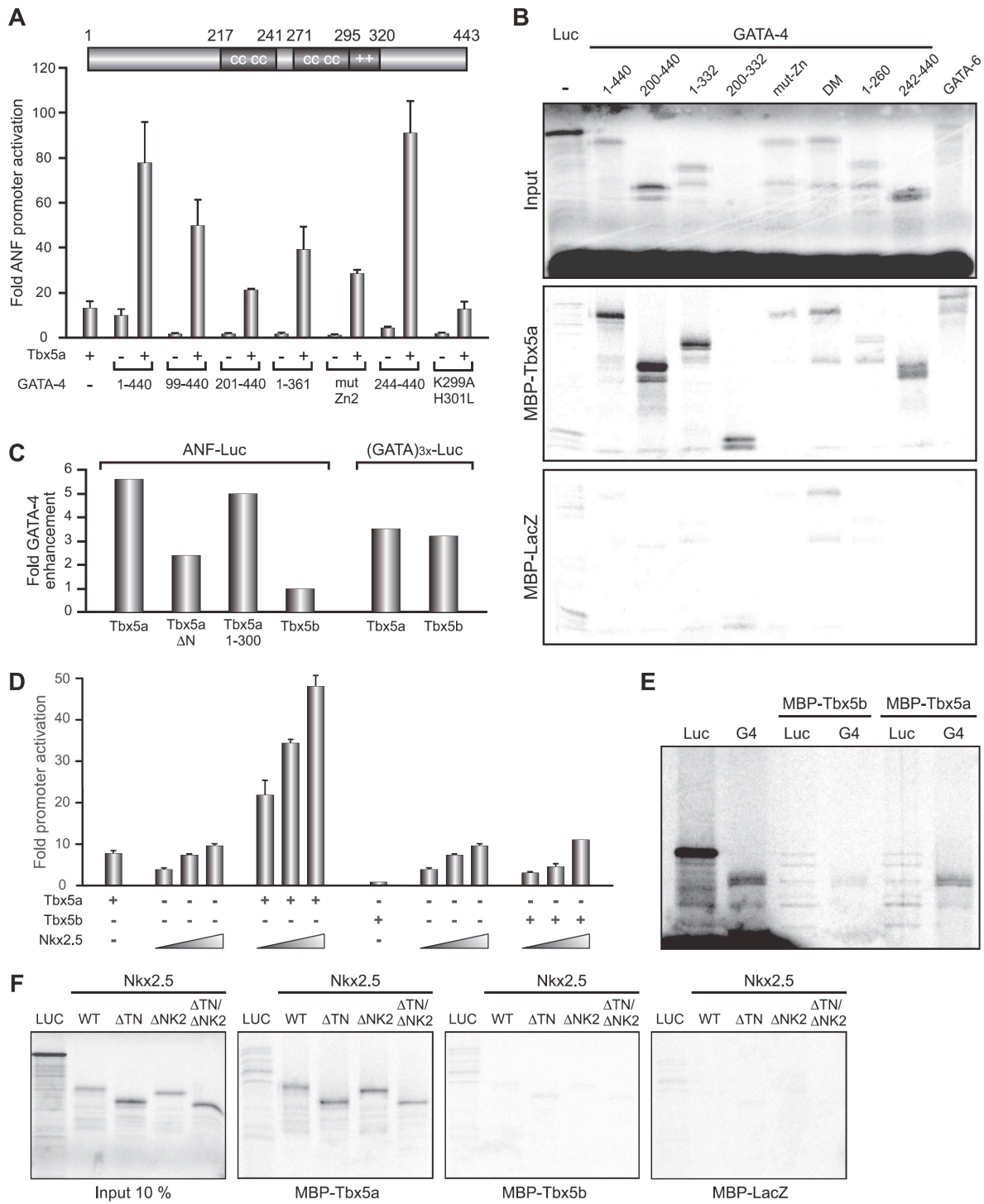


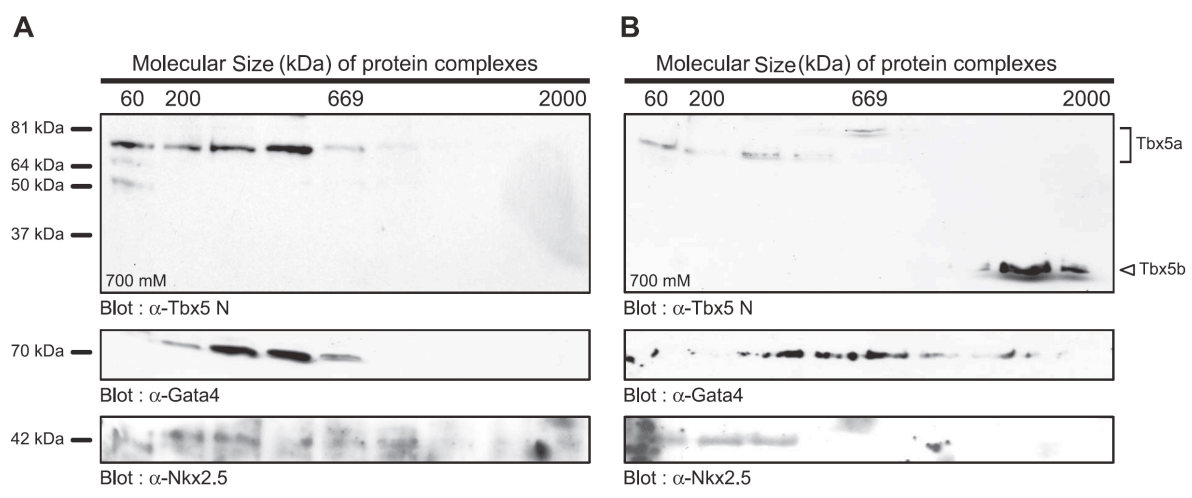
**Figure 2.3. Endogenous TBX5 expression in cardiac cells.**



**Figure 2.4. Structure-function analysis of TBX5.**

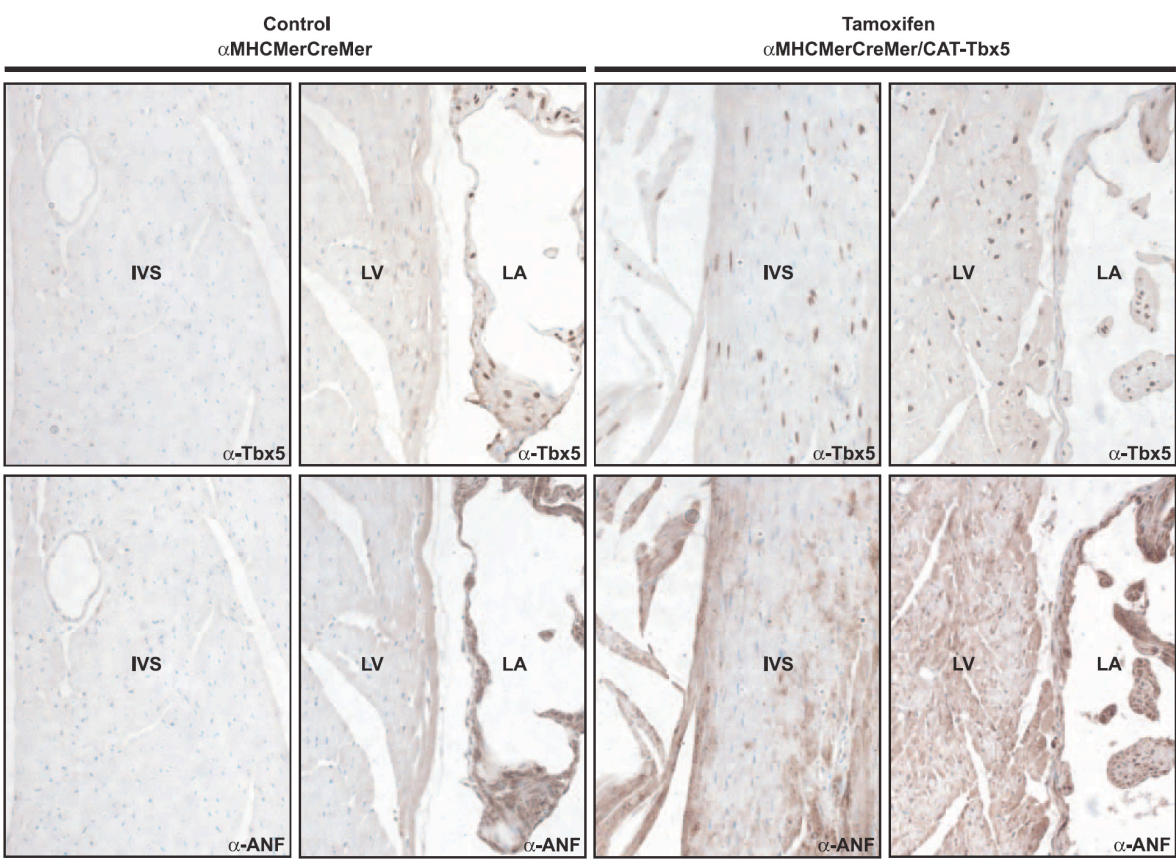
**Figure 2.5. Differential ability of the two *Tbx5* isoforms to bind DNA and activate transcription.**



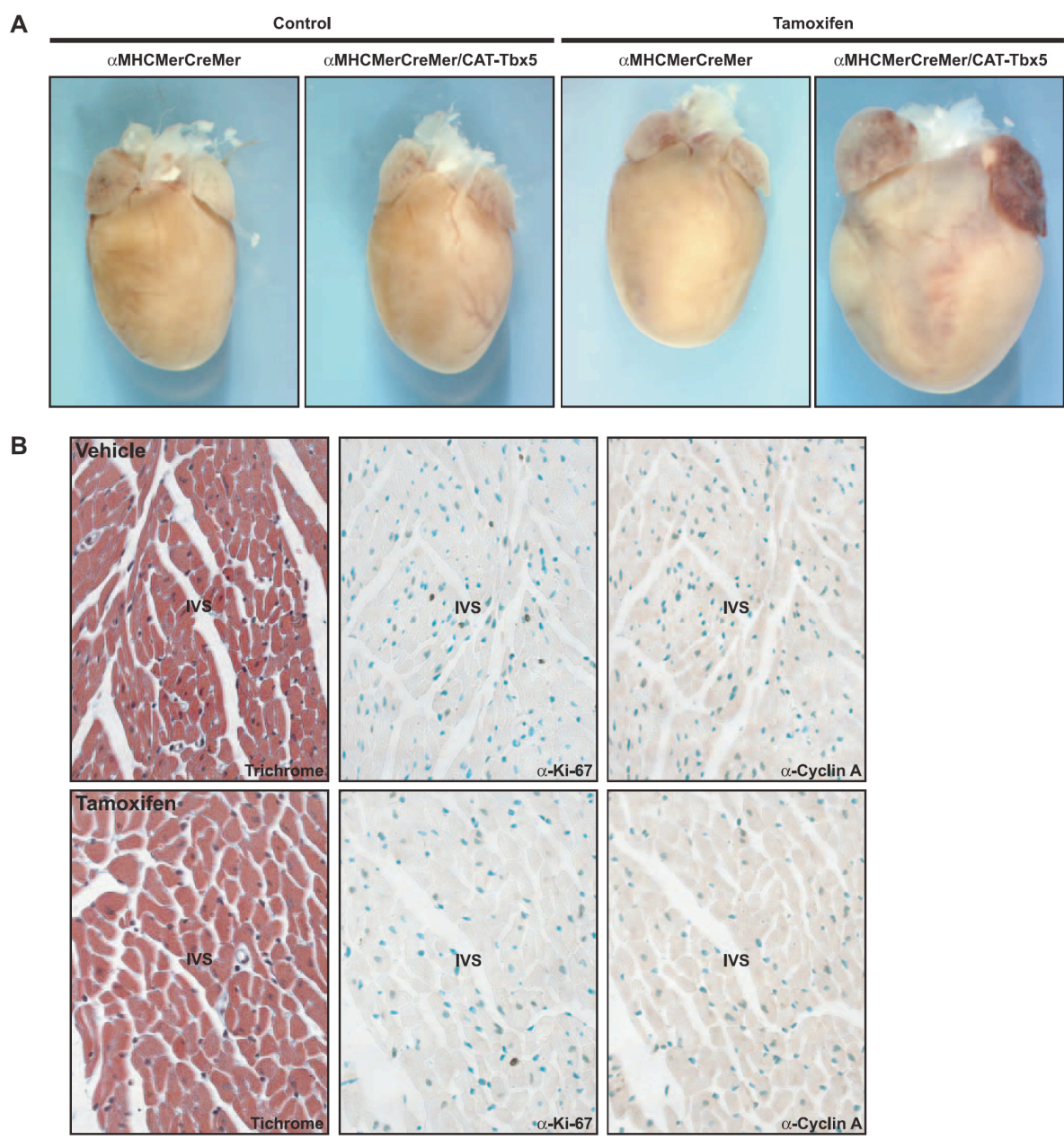


**Figure 2.7. Elution profile of endogenous TBX5, NKX2.5 and GATA-4.**

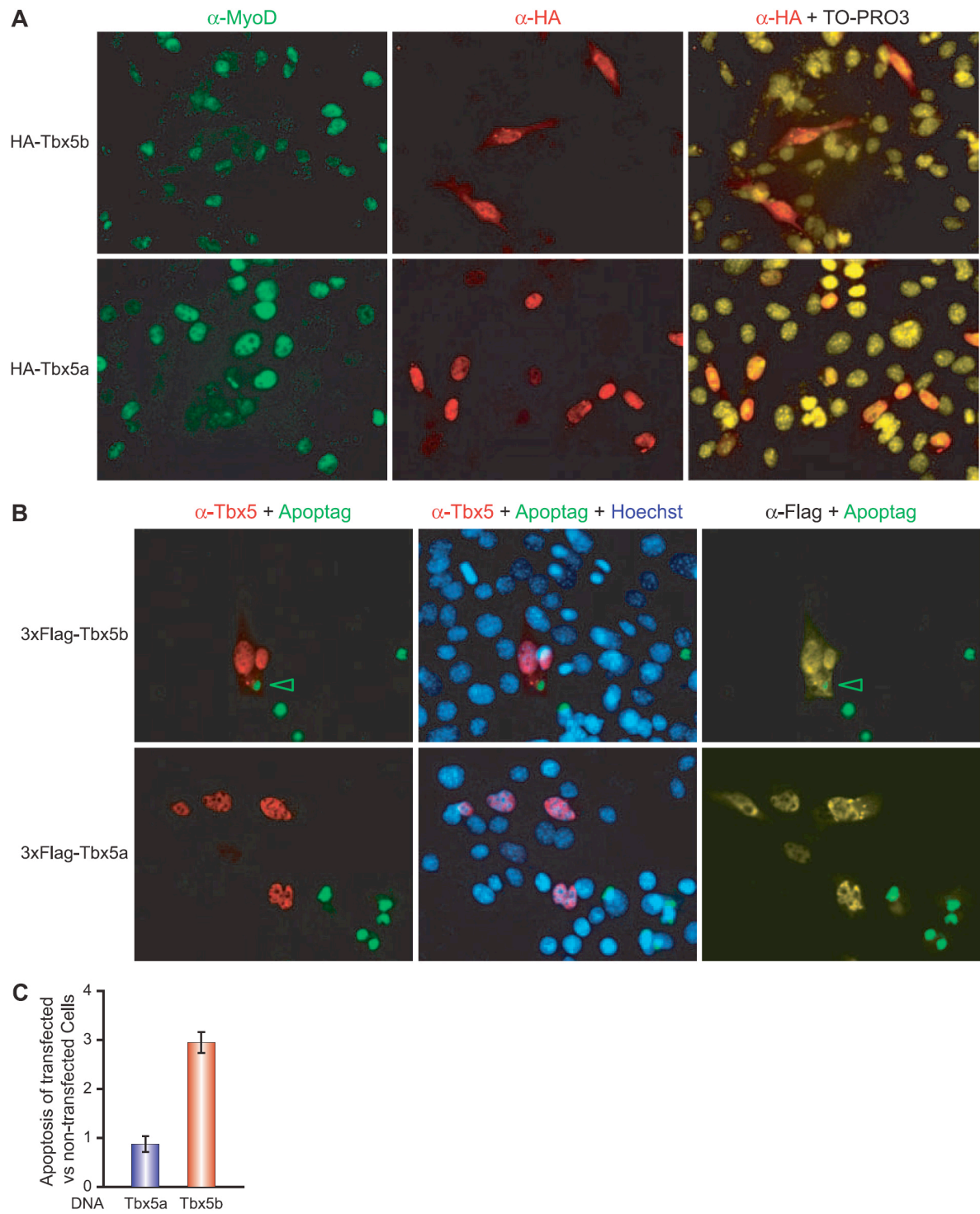




**Figure 2.8.** Immunohistochemical analysis of heart sections from adult transgenic mice ectopically expressing (right panels) or not (left panels) TBX5a.



**Figure 2.9. Reexpression of *Tbx5a* in adult hearts leads to cardiomyocyte hypertrophy.**



**Figure 2.10. Differential effects of transient transfection of *Tbx5* isoforms in C2C12 myoblasts.**



# **Chapitre 3. An endocardial pathway involving Tbx5, Gata4 and Nos3 required for atrial septum formation. (*Publié*).**

**Running head: Essential role of endocardial *Tbx5***

**Mathieu Nadeau<sup>a,b,1</sup>, Romain O. Georges<sup>a,b,1</sup>, Brigitte Laforest<sup>a,b</sup>, Abir Yamak<sup>a,c</sup>, Chantal Lefebvre<sup>a,b</sup>, Janie Beauregard<sup>a,c</sup>, Pierre Paradis<sup>a,2</sup>, Benoit G. Bruneau<sup>d</sup>, Gregor Andelfinger<sup>a,e</sup>, Mona Nemer<sup>a,c,3</sup>**

<sup>1</sup>Co-first authors

<sup>a</sup>Research Unit in Cardiac Growth and Differentiation

<sup>b</sup>Programme de biologie moléculaire, Université de Montréal, C.P. 6127, succ. Centre-Ville, Montréal, QC, H3C 3J7, CANADA

<sup>c</sup>Department of Biochemistry, Microbiology and Immunology, University of Ottawa, 550 Cumberland (246), Ottawa, ON, K1N 6N5, CANADA

<sup>d</sup>Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, Department of Pediatrics, University of California, 1650 Owens Street, San Francisco, CA, 94158, USA

<sup>e</sup>Hôpital Ste-Justine, Département de Génétique Cardiovasculaire, # 6954, 3175, Côte Sainte Catherine, Montréal, QC, H3T 1C5, CANADA

<sup>2</sup>present address, Lady Davis Institute for Medical Research, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

**Keywords:** congenital heart disease; transcription factor; heart development; apoptosis; Holt-Oram syndrome; gene; environment interactions

<sup>3</sup>**Corresponding Author:** Dr Mona Nemer Department of Biochemistry, Microbiology and Immunology, University of Ottawa, 550 Cumberland (246), Ottawa, ON, K1N 6N5, CANADA. Tel.: 613-562-5270 / Fax: 613-562-5271.

### 3.1 Contributions

**Romain O. Georges:** J'ai effectué la majorité des dissections des cœurs embryonnaires et adultes pour les études d'histologies, d'immunohistologies, d'immunofluorescences afin d'analyser les phénotypes cardiaques des différentes souris mutantes, d'établir l'expression de marqueurs cardiaques (*Gata4*, *Nkx2.5*, *Sarcomeric Actin*, *Tbx5*, *Tie2*), et de mesurer l'apoptose (Apoptag) au niveau des bourrelets endocardiques auriculo-ventriculaires et du septum primum. **Mona Nemer**, **Mathieu Nadeau**, et moi avons analysé les résultats et collaboré à l'écriture du manuscrit.

**Mathieu Nadeau** a effectué les analyses physiologiques (ECG, échographie Doppler, test d'exercice sur tapis roulant) et des dissections de cœurs chez les souris mutantes adultes afin de mesurer l'hypertrophie cardiaque pathologique.

**Benoit G. Bruneau** a fourni les souris *Tbx5*<sup>flox/flox</sup>.

Ce manuscrit a été publié dans *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 05 Oct. 2010. Vol. **107**(45): pages 19356-19361. ([www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0914888107](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0914888107)) [688].

### 3.2 Abstract

In human, septal defects are among the most prevalent congenital heart disease (CHD) but their cellular and molecular origins are not fully understood. We report that the transcription factor *Tbx5* is present in a subpopulation of endocardial cells and that its deletion therein results in fully penetrant, dose-dependent atrial septal defects in mice. Increased apoptosis of endocardial cells lacking *Tbx5* as well as neighboring TBX5 positive myocardial cells of the atrial septum thru activation of endocardial nitric oxide synthase (*Nos3*) is the underlying mechanism of disease. Compound *Tbx5* and *Nos3* haploinsufficiency in mice worsens the cardiac phenotype. The data identify a novel pathway for endocardial cell survival and unravel a cell autonomous role for *Tbx5* therein. The finding that *Nos3*, a gene regulated by many CHD risk factors including stress and diabetes, interacts genetically with *Tbx5* provides a molecular framework to understand gene-environment interaction in the setting of human birth defects.

### 3.3 Introduction

In human, the incidence of congenital heart disease (CHD) is now estimated to be nearly 5% of live births (1) and CHD is the major non-infectious cause of death in infants within the first year of life. Moreover, undiagnosed less severe defects increase the risks of morbidity and premature mortality and constitute risk factors for stroke, ischemic heart disease and sudden death (2). Secundum atrial septal defect (ASD) is the third most common congenital heart malformation (3) and occurs as an isolated defect or as a feature of more complex syndromes (4). A complex multifactorial inheritance model involving alterations in multiple genes and interactions with environment factors has been suggested to account for the lower penetrance and variable expressivity of familial ASDs (5). Heart development requires differentiation, proliferation and cell-cell communication between two cell layers composed of myocardial and endocardial cells. Significant progress was accomplished in the past decade in identifying the molecules and mechanisms involved in myocardial cell differentiation (reviewed in (6, 7)). Several key regulators of myocardial patterning and chamber specification have been identified. They include transcription factors *GATA4*, *NKX2.5* and *TBX5* mutations of which have been associated with human atrial septal defects (4). In contrast, molecular pathways involved in differentiation of the endocardium are only beginning to be elucidated. Valvuloseptal tissues arise from endocardial cells that undergo an epithelial-mesenchymal transformation (EMT); this process is regulated by myocardial-derived growth factors such as bone morphogenetic proteins (BMP-2/-4) and VEGF (8, 9). Because genes linked to septal defects (either in human or in animal models of disease) are either expressed predominantly in myocardial cells or are co-expressed in myocytes and endocardial cells, the cellular basis of septal defects remains undefined.

The molecular pathways underlying endocardial development remain incompletely understood (10-13). A recent report identifies the Ets-related protein-71 as obligatory for endothelial/endocardial specification (14). Consistent with this, FoxC and Ets transcription factors are sufficient to induce ectopic endothelial gene expression and their knockdown in fish disrupted vascular development (15).

Others like the basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor SCL (16) or *Tbx20* (17) and *Twist1* (18) are involved in early migration or proliferation of endocardial progenitors. Transcription factors associated with later stages of endocardial cell differentiation include *Sox9* (19), *Gata5* (20) and NFATc (8, 21, 22). Lastly, GATA4 is expressed in early endocardial progenitors and persists therein throughout development (20, 23). The exact role of *Gata4* in the endocardium is not fully understood but is thought to involve proliferation and remodelling of the endocardial cushion (24). In this study, we show that transcription factor *Tbx5*, a member of the T-box family of important developmental regulators, is expressed in endocardial cells destined to form the atrial septum where it plays a cell autonomous role in endocardial cell survival, thus identifying a novel regulatory pathway in endocardial growth and differentiation. In human, *TBX5* mutations are linked to Holt-Oram syndrome (HOS), an autosomal dominant disorder, characterized by upper limb defects and a large spectrum of cardiac malformations ranging from simple arrhythmia to complex structural malformations (25, 26). Conduction defects are thought to be a consequence of *Cx40* dysregulation. Atrial septal defects (ASDs) are the most common cardiac malformations found in HOS patients (27) and in *Tbx5*<sup>+/-</sup> mice (28) but the cellular origin of the defects remains unknown. We now show that endocardial-specific mutation of *Tbx5* causes dose-dependent ASDs and that endocardial *Tbx5* interacts genetically with *Gata4* and endocardial nitric oxide synthase (*Nos3*) to regulate cell survival and atrial septum formation. The data provide a mechanism to explain synergy between a transcription factor and an enzyme in the congenital heart disease.

### 3.4 Results

#### Loss of *Tbx5* from the endocardium leads to congenital heart disease.

To better identify the cellular distribution of TBX5 within the heart, we performed high-resolution immunohistochemical analysis of TBX5 protein in the developing heart. Labeling with two different TBX5-specific antibodies revealed strong nuclear labeling in atrial and left ventricular myocytes consistent with previous reports on the distribution of *Tbx5* transcripts (27, 28). In addition, labeling was found in cells of the endocardial cushions and in endocardial cells lining the atrial septal walls starting around e12.5. In contrast to GATA4 whose expression marked all cells of the endocardial cushion, TBX5 localized only in a subset of EC cells (Fig. S1). To assess the role of *Tbx5* in endocardial cells, mice with endocardium-specific deletion of *Tbx5* were generated by breeding *Tbx5* flox mice (28, 29) with *Tie2*-cre transgenic mice (30). This breeding removes *Tbx5* alleles from all endothelial cells but since *Tbx5* is not expressed in vascular endothelium, the loss of *Tbx5* function is restricted to the endocardium. Genotyping of resulting offsprings showed that all the expected genotypes were present in a Mendelian ratio indicating that removal of *Tbx5* from endocardial cells is not embryonic lethal. This contrasts with the embryonic lethality of *Tbx5* null mice (28). Immunohistochemistry of tissue sections confirmed loss of TBX5 from EC but not myocardial cells (Fig. 1A).

Anatomical examination of adult mice with homozygous deletion of *Tbx5* from the endocardium (*eTbx5*<sup>-/-</sup>) revealed a cardiac phenotype. At first sight, a right atrial dilatation was evident (Fig 1B, top panel) and heart size appeared increased mostly due to right ventricular enlargement. A lateral view of the hearts revealed the presence of a *secundum* type atrial septal defect (ASD) in *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice and a patent foramen oval (PFO) in the heterozygote mice (Fig. 1B, bottom panel and Video S1, S2, S3). Dissection of over 20 hearts for each genotype revealed a 65% penetrance of PFOs in *eTbx5*<sup>+/-</sup> and 100% penetrance of ASDs (mostly total absence of atrial septum) in *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2A). By comparison, the frequency of ASD was 3% (1/40) in control and *Tie2Cre-Tbx5*<sup>wt/wt</sup> mice. Direct measurements

of chamber mass confirmed right heart enlargement with increased weight of the right atrium and ventricle in *eTbx5<sup>-/-</sup>* mice while no change was found in the left atrium and ventricle (Fig. 2B). Mice lacking *Tbx5* in the endocardium were compared with mice lacking one *Tbx5* allele in all cell types produced by crossing with CMV-Cre transgenic mice. *Tbx5<sup>+/-</sup>* mice (n=20) showed an intermediary phenotype between *eTbx5<sup>+/-</sup>* and *eTbx5<sup>-/-</sup>*. Consistent with previously published work (28), they displayed right atrial hypertrophy, ASD and larger hearts (Fig. 1B, right panel). Histologic analysis (Fig. 2A) revealed ASDs and thinning of the valvulus foramen ovalis (VFO). These results suggest that myocardial *Tbx5* also contributes to proper formation of the atrial septum.

Since heterozygote *Tbx5* mice have conduction defects (28), electrophysiology of *eTbx5<sup>-/-</sup>* mice was assessed using both surface and ambulatory ECG. In young 120 days mice, there was no significant difference between *eTbx5<sup>-/-</sup>* mice and their littermate control. In aging (450 d) mice, cardiac arrhythmias corresponding to ventricular bigeminism and compensatory pauses were observed in 20% of old *eTbx5<sup>-/-</sup>* mice (Fig. S2). This was probably due to early ventricular depolarization, which could originate in the hypertrophied right ventricle; the sinus rhythm was normal as indicated by equally spaced PP intervals in *eTBX5<sup>-/-</sup>* mice (Fig. S2).

Cardiac hemodynamic of *eTbx5<sup>+/-</sup>* and *eTbx5<sup>-/-</sup>* mice was evaluated by pulse wave (PW) Doppler echography. As expected in the presence of ASD with a left-to-right shunting, the pulmonary valve (PV) pressure gradient was increased in *eTBX5<sup>-/-</sup>* mice (Fig. 2C). The increased flow to the right atrium caused a volume overload on the right ventricle, which resulted in increased pulmonary flow. Pulmonary volume overload was also evident from increased lung weights in *eTbx5<sup>+/-</sup>* and *eTbx5<sup>-/-</sup>* mice (Fig. 2B). Surprisingly, 23 % (3/13) of the *eTBX5<sup>-/-</sup>* mice presented an increased mitral valve (MV) but normalized PV pressure gradient (Fig. 2C) that could be due to a reversal of the left-to-right shunting. This has been observed in human with right ventricle failure or stiffness where the left-to-right shunting decreases and the right-to-left shunting may occur and increase the flow in the left atrium causing the increase in MV flow (31, 32). Other causes explaining the increased MV pressure gradient were eliminated. Upon close examination of

MV, no stenosis was observed but in a few *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice, the mitral valve appeared thickened. Furthermore, no ductus arteriosus was observed in the *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice. Left ventricle diastolic function, which could also affect the MV pressure gradient, was examined by intracardiac catheterization using a 1.4 F Millar pressure catheter but no alterations were detected. The time constant ( $\tau$ ) of LV isovolumetric pressure decline was not changed in *eTbx5*<sup>+/-</sup> and *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2D). The impact of the cardiac defect on exercise tolerance using treadmill evaluation revealed an exquisite *eTbx5* dose-dependence (Fig. 2E). A fractional treadmill success graph shows that none of the *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice was able to complete the exercise protocol whereas 100% of control littermates succeeded. Mice with one *eTbx5* allele had an intermediate profile. Together, these data indicate that endocardial *Tbx5* is essential for proper atrial septal formation and point to a primary role for the endocardium in the pathogenesis of ASDs.

### ***Nos3* is a genetic modifier of *Tbx5* in atrial septal formation**

We used *eTbx5*<sup>+/-</sup> to identify genetic modifiers of endocardial *Tbx5* that contribute to CHD. Two endocardially-expressed genes, *Gata4* and *Nos3* (which encodes endothelial nitric oxide synthase) were tested. GATA4 physically and functionally interacts with *TBX5* (33) and a mutation in *GATA4* that inhibits *in vitro* interaction with *TBX5* has been linked to human ASD (34). We tested whether disruption of this interaction in the endocardium is linked to ASDs. *eTbx5*<sup>+/-</sup> mice were crossed with *Gata4*<sup>+/-</sup> mice (35). Compound haploinsufficiency of *Gata4* and *eTbx5* resulted in reduced viability as double heterozygote mice were born at a lower frequency than expected (16% vs 25%). Postnatally, 40% of double heterozygotes were lost before weaning; surviving pups displayed severe atrial septal defects that were consistently far more pronounced than their parents or littermates with only a single deleted allele (Fig. 3A). These results provide genetic evidence that *Gata4* and *Tbx5* cooperatively regulate cardiac development. Furthermore, they indicate that *Gata4/Tbx5* interaction in endocardial cells is essential for proper heart morphogenesis and that mutations in their genes or a decrease in their level or activity may increase the susceptibility for CHD. Next, we tested whether *Nos3*, a GATA regulated gene (36), may be a target/effector of



TBX5 and GATA4 in endocardial cells. Mice with null deletion of *Nos3* display ASDs with very high incidence but heterozygous littermates have no overt cardiac defects (37). *Nos3*<sup>+/-</sup>/*eTbx5*<sup>+/-</sup> mice had reduced viability (by 60%) and the vast majority of the ones who survived to weaning showed type 2 overt ASDs (Fig. A, right panel) whereas mice lacking a single *Nos3* allele presented an intact atrial septum. These results suggest genetic interaction between *Nos3* and *Tbx5*. The possibility that *Nos3* may be a downstream TBX5 target was examined. Transient transfection of *Tbx5* in the TC13 endocardial progenitor line (20) resulted in 3.5X upregulation of endogenous *Nos3* transcripts (Fig. 3B). Bioinformatic analysis of the murine *Nos3* locus revealed the presence of 3 canonical TBX5 binding sites; 2 of which are flanked by a conserved GATA binding site with the proximal pair being part of an evolutionary conserved composite element that binds both GATA4 and TBX5 with high affinity (Fig. 3F). The ability of TBX5 and GATA4 to activate individually and cooperatively *Nos3* transcription was directly tested using a well studied NOS3-Luc reporter (36). As shown in Fig. 3C, this promoter is highly active in the endocardial TC13 cell line (150x higher than in cardiomyocytes or fibroblasts). Transfection of either *Tbx5* or *Gata4* enhanced *Nos3* promoter activity in a dose dependent manner (Fig. 3D). Additionally, cotransfection with limiting amounts of both proteins produced cooperative transcriptional enhancement (Fig. 3E); a GATA4 mutant (G295S) that abrogates physical interaction with TBX5 (34) failed to cooperatively activate the *Nos3* promoter. Mutation of the composite TBE-GATA element abrogated *Tbx5*/GATA4 effects (Fig. 3E). These results suggest that *Nos3* is a common TBX5/GATA4 target in endocardial cells. They also show that compound haploinsufficiency of *eTbx5* and *Nos3* exacerbates the cardiac phenotype caused by deletion of a single *Tbx5* allele from endocardial cells, suggesting that *Nos3* may be a genetic modifier of *Tbx5*. Given that expression and/or activity of *Nos3* is regulated by growth factors including insulin as well as hormonal and mechanical stimuli (38), genetic interaction between *Tbx5* and *Nos3* may provide a molecular paradigm for understanding gene-environment interactions in CHD.

### **Loss of *eTbx5* causes excessive apoptosis in the septum primum**

In endothelial/endocardial cells, *Nos3* is the main producer of NO which protects cells from apoptosis by inhibiting caspase activity through S-nitrosylation of an essential cysteine residue (39). *Nos3* null fetal hearts display increased apoptosis (37). The finding that *Nos3* is a downstream TBX5 target raised the possibility that increased apoptosis may be the mechanism underlying ASDs in *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice. TUNEL assays indicated excessive apoptosis of the septum primum in *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice. To facilitate localization of endocardial cells and determine the exact cell types undergoing apoptosis within the septum primum, *eTbx5*<sup>-/-</sup> were crossed into the Rosa26 transgenic line. Embryo tissue sections were co-stained with anti-βgalactosidase (LacZ) antibody to label endocardial cells and anti-sarcomeric actin to label myocardial cells (Fig. S3). *eTbx5*<sup>-/-</sup> showed increased apoptosis of both endocardial and myocardial cells of the septum primum (Fig. 4A). No increase of apoptosis in myocardial or endocardial cells in other regions of the heart was noted. BrdU labeling showed no detectable differences in cell proliferation on consecutive sections (Fig. S3 and 4B). These data suggest that TBX5 is required for endocardial cell survival and endocardial-myocardial cross talk. The effect of TBX5 on cell survival may be mediated by its activation of *Nos3*, which can also explain how loss of *Tbx5* from endocardial cells affects survival of neighboring, *Tbx5*-expressing myocytes through the production of NO. Additionally, we found that TBX5 regulates the antiapoptotic gene *BclXL*. In *eTbx5*<sup>+/-</sup> hearts, *BclXL* transcripts were significantly decreased by 40% and NOS3 levels were consistently found reduced by 25% (Fig. 4C). Transient overexpression of *Tbx5* in the TC13 endocardial progenitor cell line resulted in 60% increase in endogenous *BclXL* levels. Co-transfection of the *BclXL*-luciferase reporter with a *Tbx5* expression vector resulted in 3-fold enhancement of *BclXL* promoter activity. When GATA4 (an upstream activator of *BclXL* (35)) was added, synergistic activation of *BclXL* dependent transcription was produced (Fig. 4D). Thus, *BclXL* appears to be a target of a TBX5/GATA4 transcription complex and a common effector of their cell survival function.

To ascertain whether apoptosis or altered proliferation were the mechanism of ASD in *eTbx5/Gata4* and *eTbx5/Nos3* double hets, immunohistochemistry was carried out on tissue sections from E12.5 embryos. As shown in Fig. 4E, TUNEL

assays revealed significantly increased apoptosis of both endocardial and myocardial cells of the atrial septum in *eTbx5/Gata4* and *eTbx5/Nos3* double het mice as compared to either single het. However, there was no detectable difference in Ki67 positive cells between the different genotypes (Fig. 4F). Together, the results indicate that *Nos3* and *BclXL* are independent effectors of TBX5 in endocardial cell survival and unravel a cell autonomous role for TBX5 in differentiation/survival of septum primum endocardial cells; moreover, they suggest that TBX5 activates therein a system(s) involved in survival of neighboring myocytes that could involve, at least in part, endocardial *Nos3*-generated NO.

### 3.5 Discussion

Formation of the cardiac septa and valves is essential for proper blood flow and is vital for our organism and our day-to-day activities. These delicate leaflets develop through a complex multistage process involving highly regulated interactions among different cell types. The results presented identify a novel transcription pathway required for differentiation and survival of a subpopulation of endocardial cells involved in interatrial septal formation and suggest early patterning within the endocardial lineage. This new insight will facilitate identification of the molecular circuits that underlie the various developmental stages of the endocardial lineage. The work also identifies a novel cellular pathway to one of the most common forms of CHD. Lastly, the finding that *Nos3*, a gene regulated by conditions known to be risk factors for CHD, interacts genetically with *Tbx5*, provides a framework for understanding gene-environment interactions in the setting of human congenital heart disease.

#### **Patterning, differentiation and apoptosis in the endocardial lineage**

Over the last years, lineage tracing experiments, expression analysis of early myocardial markers, as well as genetic manipulations in several experimental models have established the antero-posterior patterning of the developing myocardium. While it is clear that the outer myocardial layer of the heart tube is already patterned, little is known on the spatial specification of the inner endocardial layer. Moreover, early markers of the endocardial lineage such as *Gata4* and *Tbx20* are broadly expressed in all endocardial cells (23, 40). Others, like *Gata5* or *Sox9* are expressed later in endocardial development but do not show regionalization (19, 20). Reports of regionalized expression in the endocardium are limited. Transcription factor SOX4 was shown to be present only in endocardial ridges and mouse embryos with null *Sox4* alleles have impaired semilunar valve development, common arterial trunk and die at e14 of circulatory failure (41). Additionally, a 250 bp *NFatc1* enhancer was shown to be expressed in a subpopulation of presumed pro-valve endocardial cells of the atrioventricular canal and outflow tract (42). Interestingly, mutation of a Hox site therein

derepressed expression in other endocardial cells suggesting that regionalization may result from the interplay of positive and negative regulatory pathways. Of note *NFatc1* inactivation in mice leads to embryonic lethality and valve but not septal defects (22). In the present paper, we show that *Tbx5* is expressed in specific cells of the septum primum and that its deletion therein causes excessive apoptosis and fully penetrant atrial septal defects. Thus, *Tbx5* appears to be an exquisite marker of a subset of endocardial cells destined to form the atrial septum. This finding could help further characterize the differentiation pathway and genetic profile of these cells. Aberrant apoptosis accompanies many structural cardiac defects but the molecules and pathways regulating endocardial cell survival are not fully understood (43-45). Here, we show that *Tbx5* is a critical survival factor for endocardial cells. Moreover, we provide biochemical and genetic evidence for interaction between *Tbx5* and *Gata4*, whose mutation in human causes septal defects (34). Cooperative TBX5/GATA4 interaction was previously shown to regulate the myocardial *Nppa* gene (33, 34). The work presented here extends this interaction to the endocardium and identifies two new *Tbx5* target genes, *BclXL* and *Nos3*.

During the finalization of the manuscript, Maitra et al reported that mice heterozygous for *Gata4* and *Tbx5* are embryonic or neonatal lethal with severe septal and valve defects (46). These results are consistent with the existence of genetic interaction between *Gata4* and *Tbx5* in several heart structures but must be interpreted in the context of the phenotype of *Tbx5*<sup>+/-</sup> mice who have a broad spectrum of CHD, including ASD, VSD, AVSD and conduction defects (28). They nevertheless support our results, which further identify the endocardium as a cellular target for TBX5/GATA4 interactions. Interestingly, whereas Maitra et al found decreased proliferation in *Tbx5/Gata4* double hets, we found only evidence of increased apoptosis, suggesting distinct roles for *Tbx5* in endocardial and myocardial cells. This was further supported by gain of *Tbx5* function in cultured cells. Finally, the fully penetrant dose-dependent phenotype of *eTbx5* null mice is noteworthy. This essential cell autonomous role in atrial septal formation suggests that mutations in *Tbx5* may be found in patients with isolated ASDs. Consistent

with this, several recent reports have found mutations in *Tbx5* in non-syndromic cases of ASDs (47, 48).

### **Genetic predisposition and environmental risk factors in congenital heart disease**

The variable expressivity of congenital heart disease, the complex pattern of inheritance, together with the identification of environmental risk factors have led to the conclusion that phenotypic manifestation of most CHDs is likely the result of both genetic and environmental factors. This is even the case with an autosomal dominant syndrome like Holt-Oram where variable expressivity of the same mutation among affected family members remains unexplained (49). On the other hand, a number of environmental factors and maternal conditions have been linked to increased risks of congenital heart disease. They include among other nutrition, cigarette smoking, vitamin deficiencies, hypertension and diabetes (50). The finding that *Nos3* and *Tbx5* genetically interact and that *Nos3* haploinsufficiency contributes to *Tbx5*-dependent CHD development is especially noteworthy as it provides a molecular framework for understanding gene-environment interaction in development and disease. *Nos3* activity is regulated by numerous conditions and extracellular stimuli including growth factors, histamine, adrenergic agonists, stress and diabetes, many of which have been linked to increased risks of developmental defects (51). Interestingly, a G894T polymorphism causing decreased enzyme activity and NO production (52) has been associated with increased risks of CHD (53). Our results show that mice with heterozygous mutation in *Nos3* have no overt cardiac phenotype. However, compound *eTbx5* and *Nos3* heterozygous mice have large ASDs, thus providing a molecular understanding for the increased CHD risk in human with the G894T *Nos3* genotype and direct evidence for a role of *Nos3* as a *Tbx5* modifier in CHD. It also explains the synergistic relationship between a transcription factor and a highly regulated enzyme in cardiac pathogenesis. Finally, the finding that PFO and ASD occur in an *eTbx5* dose-dependent manner suggests common genetic determinants and may explain the lower than expected penetrance of familial ASDs. The fact that compound haploinsufficiency of another gene leads to overt ASDs in the offsprings of a PFO

carrier lends experimental proof to the emerging view that CHD is the result of multiple genetic alterations and points to the importance of careful cardiac evaluation in the stratification of human subjects in genetic studies.

### **3.6 Materials and methods**

#### **Animal experimentation**

Mice handling and experimentation were performed in accordance with institutional guidelines and were approved by the Animal Care Committee. Mice studied were maintained in 129Sv/B6 mixed background. Surface ECG were performed as previously described (54). Ambulatory ECG recordings were obtained by subcutaneous implantation of a TA10EA-F20 wireless radiofrequency telemetry device (Data Sciences International, St-Paul MN). Surface and ambulatory recordings were analyzed using the ECG auto program (EMKA technology). Echocardiography was performed as previously described (35). Hemodynamic studies were performed using the Millar pressure catheter (55). Exercise tolerance test was determined using a treadmill with step of 10 min at 15, 20, 22.5 and 25 m/min. Stainless steel bars at the end of the lines provided an electrical stimulus of 0.16 mA to keep the mice running. The number of time the animal received an electric stimulus is recorded automatically and the cumulative count saved for each step. If a mouse is not able to run and stays on the stainless steel grids 10 s, the electric stimulus is stopped and the failing step is recorded. Data are presented as fractional treadmill success graph. More details in supplementary material and methods.

#### **Statistics**

The data are presented as mean  $\pm$  SEM. For comparison of multiple groups with  $n = 5$  to 10, Kruskal wallis non-parametric statistical test was used.

#### **Cell and molecular manipulation**

See supplementary material and methods section



### 3.7 Acknowledgements

The authors thank Nathalie Bouchard for technical assistance, Annie Vallée for help with histology, and Lise Laroche and Hélène Touchette for expert secretarial work. GA is a clinician scientist of the Canadian Institutes for Health Research. MN was recipient of a Canada Research Chair. This work was supported by grants from CIHR to GA and MN (MOP13057 and GMH79045) and from the Heart and Stroke Foundation of Ontario. The authors declare that there is no conflict of interest.

**Additional information.** This article contains supporting information online at

[www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.0914888107/-/DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.0914888107/-/DCSupplemental).

**Reprints and permissions** information is available at

<http://www.pnas.org/site/misc/rightperm.shtml>

### 3.8 Reference list

1. Pierpont, M. E., Basson, C. T., Benson, D. W., Jr., Gelb, B. D., Giglia, T. M. *et al.* (2007) Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation* **115**, 3015-3038.
2. Warnes, C. A. (2005) The adult with congenital heart disease: born to be bad? *J Am. Coll. Cardiol.* **46**, 1-8.
3. Hoffman, J. I. & Kaplan, S. (2002) The incidence of congenital heart disease. *J Am. Coll. Cardiol.* **39**, 1890-1900.
4. Bruneau, B. G. (2008) The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature* **451**, 943-948.
5. Benson, D. W., Sharkey, A., Fatkin, D., Lang, P., Basson, C. T. *et al.* (1998) Reduced penetrance, variable expressivity, and genetic heterogeneity of familial atrial septal defects. *Circulation* **97**, 2043-2048.
6. Olson, L. E., Tollkuhn, J., Scafoglio, C., Krones, A., Zhang, J. *et al.* (2006) Homeodomain-mediated beta-catenin-dependent switching events dictate cell-lineage determination. *Cell* **125**, 593-605.
7. Nemer, M. (2008) Genetic insights into normal and abnormal heart development. *J. Cardiovasc. Pathol.* **17**, 48-54.
8. Chang, C. P., Neilson, J. R., Bayle, J. H., Gestwicki, J. E., Kuo, A. *et al.* (2004) A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis. *Cell* **118**, 649-663.
9. Okagawa, H., Markwald, R. R., & Sugi, Y. (2007) Functional BMP receptor in endocardial cells is required in atrioventricular cushion mesenchymal cell formation in chick. *Dev. Biol* **306**, 179-192.

10. Lee, R. K., Stainier, D. Y., Weinstein, B. M., & Fishman, M. C. (1994) Cardiovascular development in the zebrafish. II. Endocardial progenitors are sequestered within the heart field. *Development* **120**, 3361-3366.
11. Kattman, S. J., Huber, T. L., & Keller, G. M. (2006) Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev. Cell* **11**, 723-732.
12. Keegan, B. R., Meyer, D., & Yelon, D. (2004) Organization of cardiac chamber progenitors in the zebrafish blastula. *Development* **131**, 3081-3091.
13. Lough, J. & Sugi, Y. (2000) Endoderm and heart development. *Dev. Dynamics* **217**, 327-342.
14. Ferdous, A., Caprioli, A., Iacovino, M., Martin, C. M., Morris, J. *et al.* (2009) Nkx2-5 transactivates the Ets-related protein 71 gene and specifies an endothelial/endocardial fate in the developing embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* **106**, 814-819.
15. De Val, S., Chi, N., meadows S.M., minovitsky, S., Anderson, J. P. *et al.* (2008) Combinatorial regulation of endothelial gene expression by ets and forkhead transcription factors. *Cell* **135**, 1053-1064.
16. Bussmann, J., Bakkers, J., & Schulte-Merker, S. (2007) Early endocardial morphogenesis requires Scf/Tal1. *PLoS Genet.* **3**, e140.
17. Shelton, E. L. & Yutzey, K. E. (2007) Tbx20 regulation of endocardial cushion cell proliferation and extracellular matrix gene expression. *Dev. Biol* **302**, 376-388.
18. Shelton, E. L. & Yutzey, K. E. (2008) Twist1 function in endocardial cushion cell proliferation, migration, and differentiation during heart valve development. *Dev. Biol* **317**, 282-295.

19. Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Behringer, R. R., Rowitch, D. H., Schedl, A. *et al.* (2004) Essential role of Sox9 in the pathway that controls formation of cardiac valves and septa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* **101**, 6502-6507.
20. Nemer, G. & Nemer, M. (2002) Cooperative interaction between GATA-5 and NF-ATc regulates endothelial-endocardial differentiation of cardiogenic cells. *Development* **129**, 4045-4055.
21. Fischer, A., Steidl, C., Wagner, T. U., Lang, E., Jakob, P. M. *et al.* (2007) Combined loss of Hey1 and HeyL causes congenital heart defects because of impaired epithelial to mesenchymal transition. *Circ. Res.* **100**, 856-863.
22. de la Pompa, J. L., Timmerman, L. A., Takimoto, H., Yoshida, H., Elia, A. J. *et al.* (1998) Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* **392**, 182-186.
23. Nemer, G. & Nemer, M. (2003) Transcriptional activation of BMP-4 and regulation of mammalian organogenesis by GATA-4 and -6. *Dev. Biol.* **254**, 131-148.
24. Rivera-Feliciano, J., Lee, K. H., Kong, S. W., Rajagopal, S., Ma, Q. *et al.* (2006) Development of heart valves requires Gata4 expression in endothelial-derived cells. *Development* **133**, 3607-3618.
25. Mori, A. D. & Bruneau, B. G. (2004) TBX5 mutations and congenital heart disease: Holt-Oram syndrome revealed. *Curr. Opin. Cardiol.* **19**, 211-215.
26. Kirchhoff, S., Nelles, E., Hagendorff, A., Kruger, O., Traub, O. *et al.* (1998) Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr. Biol* **8**, 299-302.
27. Bruneau, B. G., Logan, M., Davis, N., Levi, T., Tabin, C. J. *et al.* (1999) Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome. *Dev. Biol.* **211**, 100-108.

28. Bruneau, B. G., Nemer, G., Schmitt, J.P., Charron, F. *et al.* (2001) A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* **106**, 709-721.
29. Mori, A. D., Zhu, Y., Vahora, I., Nieman, B., Koshiba-Takeuchi, K. *et al.* (2006) Tbx5-dependent rheostatic control of cardiac gene expression and morphogenesis. *Dev. Biol.* **297**, 566-586.
30. Schlaeger, T. M., Bartunkova, S., Lawitts, J. A., Teichmann, G., Risau, W. *et al.* (1997) Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3058-3063.
31. Brickner, M. E., Hillis, L. D., & Lange, R. A. (2000) Congenital heart disease in adults. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* **342**, 256-263.
32. Minagoe, S., Tei, C., Kisanuki, A., Arikawa, K., Nakazono, Y. *et al.* (1985) Noninvasive pulsed Doppler echocardiographic detection of the direction of shunt flow in patients with atrial septal defect: usefulness of the right parasternal approach. *Circulation* **71**, 745-753.
33. Georges, R., Nemer, G., Morin, M., Lefebvre, C., & Nemer, M. (2008) Distinct expression and function of alternatively spliced Tbx5 isoforms in cell growth and differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 4052-4067.
34. Garg, V., Kathiriyia, I. S., Barnes, R., Schluterman, M. K., King, I. N. *et al.* (2003) GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* **424**, 443-447.
35. Aries, A., Paradis, P., Lefebvre, C., Schwartz, R. J., & Nemer, M. (2004) Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 6975-6980.
36. Zhang, R., Min, W., & Sessa, W. C. (1995) Functional analysis of the human endothelial nitric oxide synthase promoter. Sp1 and GATA factors are

necessary for basal transcription in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 15320-15326.

37. Feng, Q., Song, W., Lu, X., Hamilton, J. A., Lei, M. *et al.* (2002) Development of heart failure and congenital septal defects in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **106**, 873-879.
38. Massion, P. B. & Balligand, J. L. (2003) Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. *J Physiol* **546**, 63-75.
39. Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M., & Zeiher, A. M. (1997) Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J. Exp. Med.* **185**, 601-607.
40. Takeuchi, J. K., Mileikowska, M., Koshiba-Takeuchi, K., Heidt, A. B., Mori, A. D. *et al.* (2005) Tbx20 dose-dependently regulates transcription factor networks required for mouse heart and motoneuron development. *Development* **132**, 2463-2474.
41. Schilham, M. W., Oosterwegel, M. A., Moerer, P., Ya, J., de Boer, P. A. *et al.* (1996) Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4. *Nature* **380**, 711-714.
42. Zhou, B., Wu, B., Tompkins, K. L., Boyer, K. L., Grindley, J. C. *et al.* (2005) Characterization of Nfatc1 regulation identifies an enhancer required for gene expression that is specific to pro-valve endocardial cells in the developing heart. *Development* **132**, 1137-1146.
43. Abdelwahid, E., Rice, D., Pelliniemi, L. J., & Jokinen, E. (2001) Overlapping and differential localization of Bmp-2, Bmp-4, Msx-2 and apoptosis in the endocardial cushion and adjacent tissues of the developing mouse heart. *Cell Tissue Res.* **305**, 67-78.

44. Keyes, W. M. & Sanders, E. J. (2002) Regulation of apoptosis in the endocardial cushions of the developing chick heart. *Am. J Physiol Cell Physiol* **282**, C1348-C1360.
45. Zwerts, F., Lupu, F., De, V. A., Pollefeyt, S., Moons, L. *et al.* (2007) Lack of endothelial cell survivin causes embryonic defects in angiogenesis, cardiogenesis, and neural tube closure. *Blood* **109**, 4742-4752.
46. Maitra, M., Schluterman, M. K., Nichols, H. A., Richardson, J. A., Lo, C. W. *et al.* (2009) Interaction of Gata4 and Gata6 with Tbx5 is critical for normal cardiac development. *Dev. Biol* **326**, 368-377.
47. Reamon-Buettner, S. M. & Borlak, J. (2004) TBX5 mutations in non-Holt-Oram syndrome (HOS) malformed hearts. *Hum. Mutat.* **24**, 104.
48. Faria, M. H., Rabenhorst, S. H., Pereira, A. C., & Krieger, J. E. (2008) A novel TBX5 missense mutation (V263M) in a family with atrial septal defects and postaxial hexodactyly. *Int. J Cardiol.* **130**, 30-35.
49. Brassington, A. M., Sung, S. S., Toydemir, R. M., Le, T., Roeder, A. D. *et al.* (2003) Expressivity of Holt-Oram syndrome is not predicted by TBX5 genotype. *Am. J Hum. Genet.* **73**, 74-85.
50. Jenkins, K. J., Correa, A., Feinstein, J. A., Botto, L., Britt, A. E. *et al.* (2007) Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation* **115**, 2995-3014.
51. Tyagi, S. C. & Hayden, M. R. (2003) Role of nitric oxide in matrix remodeling in diabetes and heart failure. *Heart Fail. Rev.* **8**, 23-28.
52. Cherney, D. Z., Scholey, J. W., Zhou, J., Zimpelmann, J., Kennedy, C. *et al.* (2009) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the renal hemodynamic response to L-arginine. *Kidney Int.* **75**, 327-332.

53. van, B., I, Mooij, C., Kapusta, L., Heil, S., den, H. M. *et al.* (2008) Common 894G>T single nucleotide polymorphism in the gene coding for endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and risk of congenital heart defects. Clin. Chem Lab Med. **46**, 1369-1375.
54. Patel, V. V., Arad, M., Moskowitz, I. P., Maguire, C. T., Branco, D. *et al.* (2003) Electrophysiologic characterization and postnatal development of ventricular pre-excitation in a mouse model of cardiac hypertrophy and Wolff-Parkinson-White syndrome. J Am. Coll. Cardiol. **42**, 942-951.
55. Iglarz, M., Touyz, R. M., Viel, E. C., Paradis, P., Amiri, F. *et al.* (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and receptor-gamma activators prevent cardiac fibrosis in mineralocorticoid-dependent hypertension. Hypertension **42**, 737-743.



### 3.9 Supplementary materials and methods

**ECG.** Mice were induced with 5% isoflurane with oxygen and then maintained with 2% isoflurane for the length of the acquisition. Lead I and II ECG recording from mice of all three genotypes were obtained using s.c. electrodes. Ambulatory ECG recordings were obtained by s.c. implantation of a TA10EA-F20 wireless radiofrequency telemetry device (Data Sciences International). Mice were allowed a 72-h recovery period. Each mouse was then placed in an individual cage overlying a receiver and 48 h of continuous ECG recording was acquired. Surface and ambulatory recordings were analyzed using the ECG Auto program (EMKA Technology). The following intervals were analyzed: PP, PQ, QRS, QT, QTc, and RR.

**Physiology and Cardiac Function.** Mice ( $n = 10$  per group; five male, five female) were anesthetized with droperidol/fentanyl and echocardiography were performed as previously described. To compare the diastolic function, five 130-d-old littermates, males from each group, were used to measure the LV pressure by using a Millar pressure catheter (Millar Instruments). The pressure catheter was introduced in the right jugular vein of anesthetized mice and pushed in the LV. Millar recordings were analyzed with the Chart program (ADInstruments). The  $\tau$  and LV filling time were analyzed.

**Treadmill Evaluation.** A total of 23 adult mice ( $eTbx5^{-/-}$ ,  $n = 12$ ;  $eTbx5^{+/-}$ ,  $n = 5$ ;  $eTbx5^{+/+}$ ,  $n = 6$ ) were trained for 3 days on the treadmill. The treadmill was equipped with electrical bars at the rear end. These bars are connected to an analogical counter. Mice were running for 10 min at 15, 20, 22.5, and 25 m/min for a total of 40 min. As several  $eTbx5^{-/-}$  mice were unable to complete the exercise, the number of times the electrical bars were touched at each steps and the time spent on the treadmill for each mouse was recorded.

**Transfections.** TC13 cells were maintained as previously described (2) and transfected using lipofection. NIH 3T3 cells were plated in DMEM with 10% fetal bovine serum. Cells were transfected using calcium phosphate with varying doses of *Tbx5* and/or *Gata4* expression vectors. Luciferase reporter (500 ng) was used.

The *Bcl-xL* promoter plasmid was described previously. The -1.6-kbp *Nos3* promoter was a gift of W. Sessa (Yale University, New Haven, CT) and was previously described (3). Deletion and point mutants were obtained using PCR and were all confirmed by sequencing. Total DNA was kept constant by addition of empty backbone vector.

**qPCR.** qPCR analysis was performed on RNA from cells and heart tissues as described previously (4). Reverse transcription was done using Omniscript RT kit (Qiagen). qPCR was then accomplished on 1:20 diluted cDNA using Qiagen qPCR kit. DNA template and 300 nM oligonucleotides were used at an annealing temperature of 58 °C using the Quantitect SYBR Green PCR kit (Qiagen) in an MX4000 real-time PCR machine (Stratagene). The primer sequences are available on request.

**Immunohistochemistry.** Immunohistochemistry was performed as described previously. GATA4 and TBX5 polyclonal antibodies used were previously described (5, 6). The anti-NKX2-5 N-19 antibody (SC-8697X; Santa Cruz Biotechnology) was used at a dilution of 1:5,000 to detect cardiomyocytes in the tissue sample. Ki-67 antibody was purchased from Thermo Scientific. For BrdU detection, BrdU was injected 100 mg/kg i.p. in pregnant mice 1 h before euthanasia. Tissue sections from litters were stained with anti-BrdU monoclonal antibody (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa). Antibodies used were revealed by an anti-rabbit biotinylated antibody (BA-1000; Dimension) or an anti-goat biotinylated antibody (BA-5000; Dimension) diluted at 1:250 and a streptavidin-HRP conjugate diluted at 1:500 (NEL 750; Dimension). TUNEL assays were carried out using Apoptag kit (S7100; Chemicon) according to the Apoptag protocol.

**Atrial Septum Analysis.** Atria were removed from the hearts except for the atrial septum and part of the atrial roof connected to the atrial septum. Then, under the microscope, the phloxineB dye flow through the atrial shunt in *eTbx5<sup>+/-</sup>* and *eTbx5<sup>-/-</sup>* mice was captured on camera. The dye is injected in the right atria. In WT mice, the intact atrial septum prevents flow to the left atria, whereas PFOs and type II ASDs in mutant mice let the dye flow through.

1. Aries A, Paradis P, Lefebvre C, Schwartz RJ, Nemer M (2004) Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 6975-6980.
2. Nemer G, Nemer M (2002) Cooperative interaction between GATA5 and NF-ATc regulates endothelial-endocardial differentiation of cardiogenic cells. *Development*. 129: 4045-4055.
3. Zhang R, Min W, Sessa WC (1995) Functional analysis of the human endothelial nitric oxide synthase promoter. Sp1 and GATA factors are necessary for basal transcription in endothelial cells. *J Biol Chem*. 270: 15320-15326.
4. Lavallée G, et al. (2006) The Kruppel-like transcription factor KLF13 is a novel regulator of heart development. *EMBO J*. 25: 5201-5213.
5. Nemer G, Nemer M (2003) Transcriptional activation of BMP-4 and regulation of mammalian organogenesis by GATA-4 and -6. *Dev Biol*. 254: 131-148.
6. Georges R, Nemer G, Morin M, Lefebvre C, Nemer M (2008) Distinct expression and function of alternatively spliced Tbx5 isoforms in cell growth and differentiation. *Mol Cell Biol*. 28: 4052-4067.

### 3.10 Figure legends

**Figure 3.1. *Tbx5* expression in endocardial cells.** (A) Immunohistochemical analysis of *Tbx5* in wild-type (WT) and in *eTbx5* null mice (KO) at E13. Note the absence of *Tbx5* from endocardial (negative for  $\alpha$ -NKX2.5) but not myocardial cells (positive for  $\alpha$ -NKX2.5) of *eTbx5*<sup>-/-</sup> hearts (LA, left atria; RA, right atria; AS, atrial septum). (B) Anatomical analysis of *eTbx5*<sup>+/-</sup> and *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice. Different orientation of fixed hearts showing in frontal view (Top) right atrial dilatation and cardiac hypertrophy of the *eTbx5*<sup>-/-</sup> and CMV-Cre;*Tbx5*<sup>+/-</sup>. Lower panels: right lateral view that reveals, after partial excision of the right and left atria, secundum-type ASD (ASD II), indicated by the arrow.

**Figure 3.2. Histologic analysis of secundum-type ASDs in *eTbx5*<sup>+/-</sup>, *eTbx5*<sup>-/-</sup> and CMV-Cre;*Tbx5*<sup>wt/flox</sup> mice.** (A) Trichrome staining of the atrial septum of control (*Tie2-Cre;Tbx5*<sup>wt/wt</sup>), *eTbx5*<sup>+/-</sup>, *eTbx5*<sup>-/-</sup> and CMV-Cre;*Tbx5*<sup>wt/flox</sup> hearts. Note the severity of the ASD II in *eTbx5*<sup>-/-</sup> (Right) compared to the *eTbx5*<sup>+/-</sup> hearts (Middle); CMV-Cre;*Tbx5*<sup>wt/flox</sup> hearts (Lower Left) show an intermediate ASD II between *eTbx5*<sup>+/-</sup> and *eTbx5*<sup>-/-</sup> hearts. (B) Weighed mass of dissected cardiac chambers and lung, corrected by femur length [RA/LA, right/left atria; RV/LV, right/left ventricle; FL, femur length; FO, fossa ovalis; VFO, valvula foraminis ovalis (embryological septum primum or flap valve); MV, mitral valve; TV, tricuspid valve; AS, atrial septum; \*depicts secundum-type ASDs (ASD II)]. (C) PV and MV pressure gradient. Pulse wave Doppler echography of control (*eTbx5*<sup>+/+</sup>), *eTbx5*<sup>+/-</sup>, and *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice revealed an increase in PV pressure gradient in 10 of 13 adult *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice. Three of 13 *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice presented an increase in MV pressure gradient but a normal PV pressure gradient that might be caused by the reversal of left-to-right shunting to right-to-left shunting. (D) No change is seen in LV diastolic function. The time constant ( $\tau$ ) of LV isovolumetric pressure was determined using intracardiac catheterization with a 1.4-F Millar pressure catheter. (E) Fractional treadmill success graph showing the fraction of mice from each genotype that completed each step of the exercise test. Note the dramatically impaired exercise endurance of *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice. (B and D) Data are presented as mean  $\pm$  SEM of n=5-10/group. (C) Pressure gradient data of each individual mouse are by an open

circle (PV) linked to a closed circle (MV); the mean  $\pm$  SEM is also shown. **B-D** \* $P < 0.05$  vs.  $eTbx5^{+/+}$ .

**Figure 3.3. Genetic interaction between *Tbx5* and *Gata4* and *Nos3*.** (A) Trichrome staining of the atrial septum of  $eTbx5^{+/-};Gata4^{wt/ko}$  and  $eTbx5^{-/-};Nos3^{wt/ko}$  mice along with their  $Gata4^{wt/ko}$  and  $Nos3^{wt/ko}$  littermates. Note the severity of the ASD II in  $eTbx5^{+/-};Gata4^{wt/ko}$  and  $eTbx5^{-/-};Nos3^{wt/ko}$  hearts. Abbreviations are as in Fig. 2. (B) Enhanced *Nos3* transcripts in TC13 cells transiently overexpressing TBX5 as revealed by quantitative PCR (qPCR). (C) *Nos3* promoter activity in various cell types. A schematic representation of the conserved *cis*-regulatory binding sites upstream of the *Nos3* gene is also shown. The results are the mean of four and are expressed relative to RSV-Luc used as external control. (D) Transient transactivation of *Nos3* promoter by TBX5 and GATA4 in NIH 3T3 cells. Fifty, 150 and 250 ng of each expression vector were cotransfected with 500 ng of reporter in NIH 3T3. The results are from one representative experiment carried out in duplicate. (E) Fold synergy of *Gata4* (50 ng) and *Tbx5* (100 ng) on different deletion or point mutants of the *Nos3* promoter in NIH 3T3 cells. (F) DNA binding of GATA4 or TBX5 expressing HEK298 cells on the proximal GATA and TBE elements of the *Nos3* promoter.

**Figure 3.4. Excessive apoptosis of the septum primum in  $eTbx5^{-/-}$  mice.** (A) Quantification of apoptotic cells observed in mutant and control mice at embryonic day 14.5. (B) Quantification of BrdU-positive cells in mutant and control mice at embryonic day 14.5 reveal undetectable change of endocardial cell proliferation. (C) Relative mRNA levels of *Tbx5*, *Nos3*, *BclXL*, and *Bcl2* in  $eTbx5$  hearts versus their WT littermates (\* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.001$ ). (D) Transient cotransfections of *Tbx5* and *Gata4* expression vectors and with the *BclXL*-Luciferase reporter in NIH 3T3 cells showing synergistic activation of the *BclXL* promoter. The results are mean  $\pm$  SEM of 6 experiments. (E) Fold change in apoptotic cells in the septum primum of  $Gata4^{wt/ko};eTbx5^{+/-}$  and  $Nos3^{wt/ko};eTbx5^{+/-}$  mice versus their  $eTbx5^{+/-}$  littermates in embryonic day 12.5 embryos. “E” stands for endocardial cells only. “M+E” represents the total cells of the septum (myocardial and endocardial). (F) Fold change in the percent of Ki67-positive cells in the septum primum of

*Gata4*<sup>wt/ko</sup>;*eTbx5*<sup>+/-</sup> and *Nos3*<sup>wt/ko</sup>;*eTbx5*<sup>+/-</sup> versus their *eTbx5*<sup>+/-</sup> littermates in embryonic day 12.5 embryos.

**Figure 3.S1. TBX5 expression in endocardial cells in late embryonic stages.**

Immunohistochemical staining with homemade polyclonal antibody directed at the N-terminal region of TBX5 ( $\alpha$ -TBX5 N) and a monoclonal TBX5 antibody directed at the C-terminal region of TBX5 ( $\alpha$ -TBX5C) on staged mouse embryos. Staining with anti-GATA4 (which marks myocardial and endocardial cells) and anti-NKX2.5 (which marks only myocardial cells) are used as control. Note the modest TBX5 staining in endocardial cells (negative for  $\alpha$ -NKX2.5) in embryonic day 9 hearts; TBX5 staining is present in endocardial cells of the atrial septum primum (AS I) and the endocardial cushion (EC) of the atrioventricular canal starting on embryonic day 12 and is clearly evident in embryonic day 14 hearts.

**Figure 3.S2. ECG recording on aged (460 d) mice.** Two typical patterns are shown for the *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice. The middle panel corresponds to mice with arrhythmias and the lower panel is characteristic of the majority of *eTbx5*<sup>-/-</sup> and control WT mice.

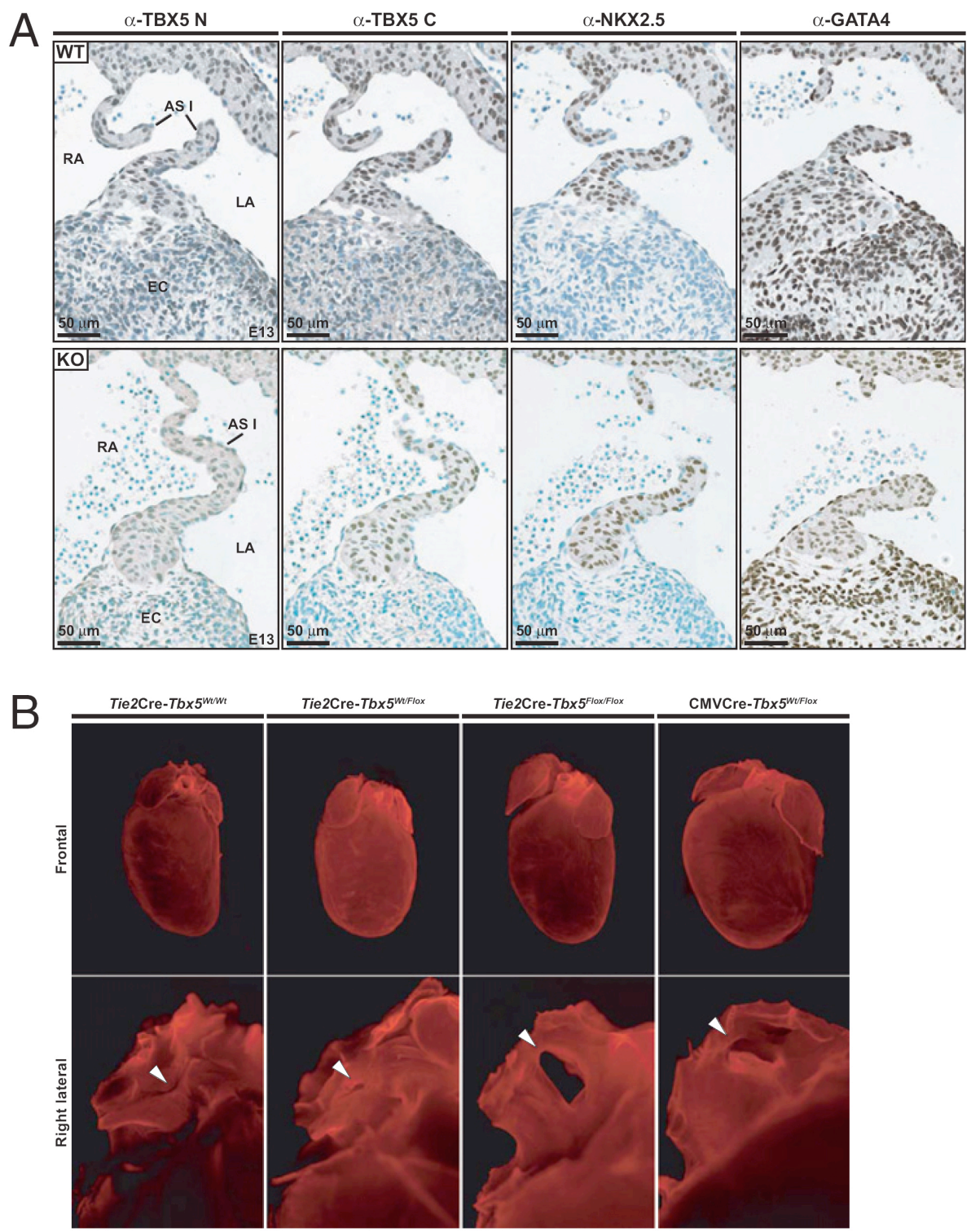
**Figure 3.S3. Excessive apoptosis of the septum primum in *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice. (A)**

Immunofluorescence TUNEL assays of *eTbx5*<sup>-/-</sup> heart sections in the Rosa26 background reveals excessive apoptosis. Apoptotic cells are in green; nuclei are stained with Hoescht (blue); endocardial cells are positive for  $\alpha$ - $\beta$ -Gal (red) and myocardial cells are positive for  $\alpha$ -sarcomeric actin (yellow). **(B)** BrdU immunofluorescence staining of consecutive tissue sections.

**Movie 3.S1.** Phloxine B dye was injected in the right atrium and prevented to flow to the left atrium by the intact interatrial septum of an *eTbx5*<sup>+/+</sup> mouse (control heart).

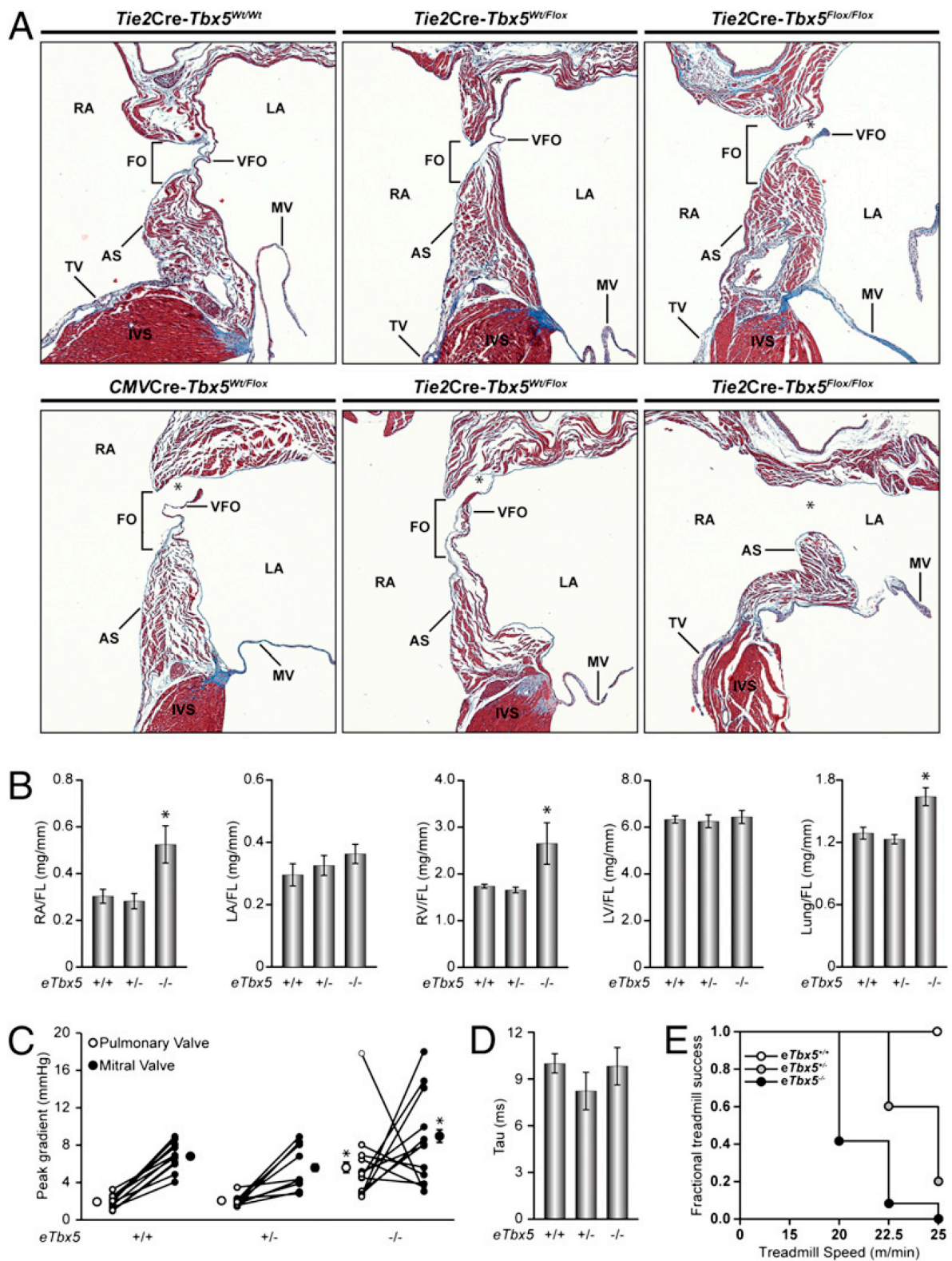
**Movie 3.S2.** Phloxine B dye flow through the atrial shunt caused by a PFO in the interatrial septum of an *eTbx5*<sup>+/-</sup> mouse.

**Movie 3.S3.** Phloxine B dye flow through the atrial shunt caused by the subtotal absence of the VFO and the superior limbus of the septum secundum in the interatrial septum of an *eTbx5*<sup>-/-</sup> heart.

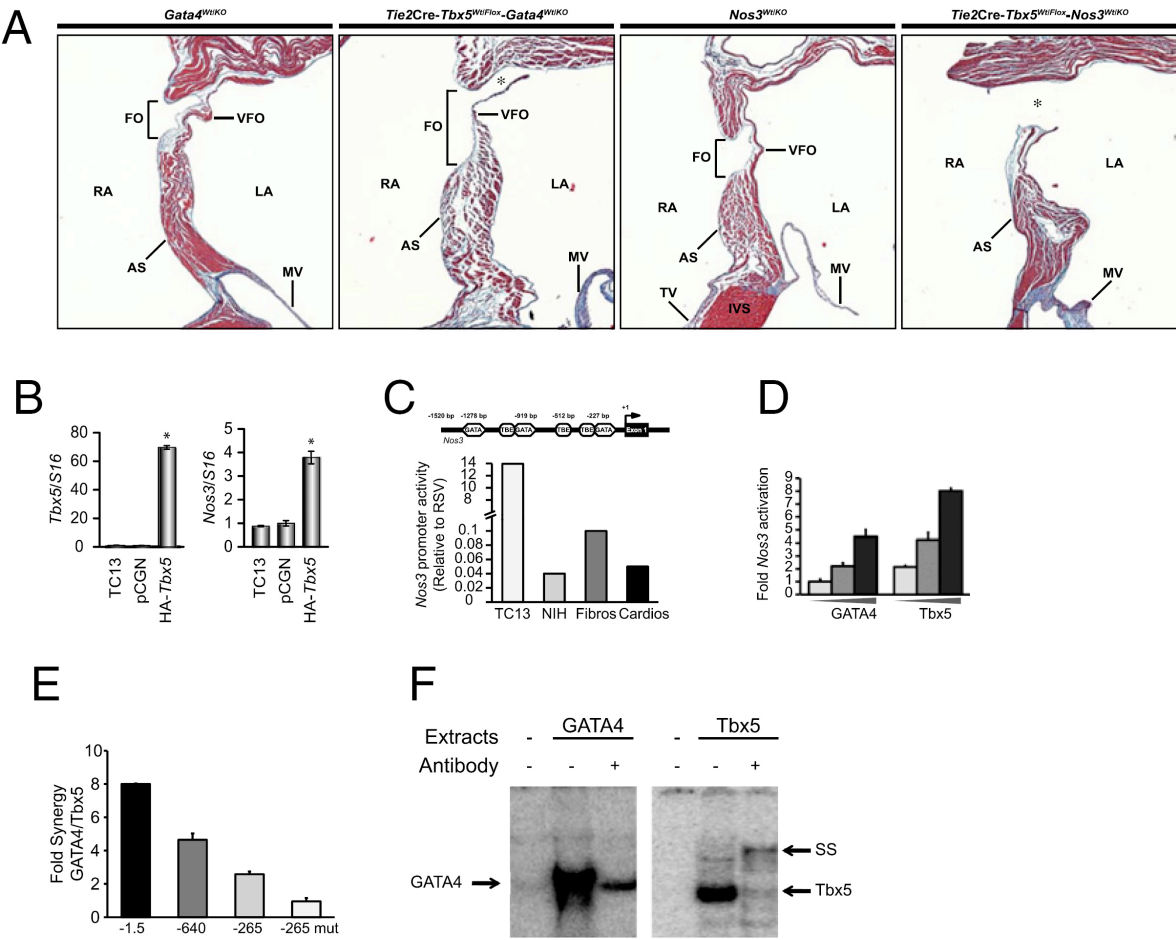


**Figure 3.1.** *Tbx5* expression in endocardial cells.

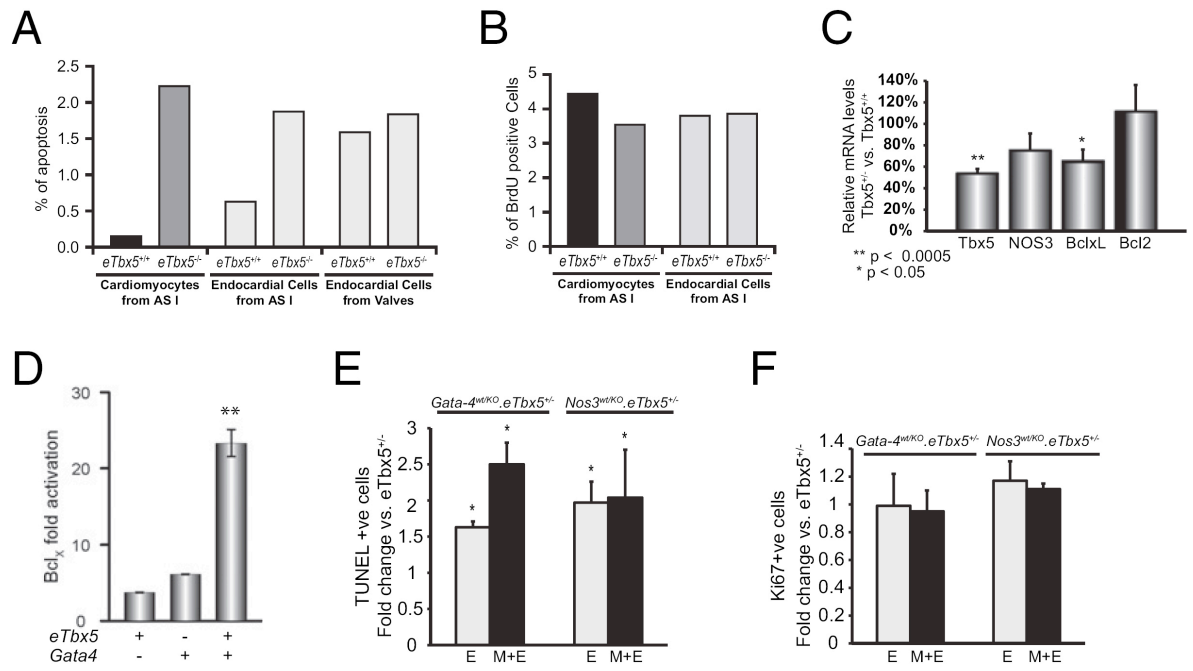




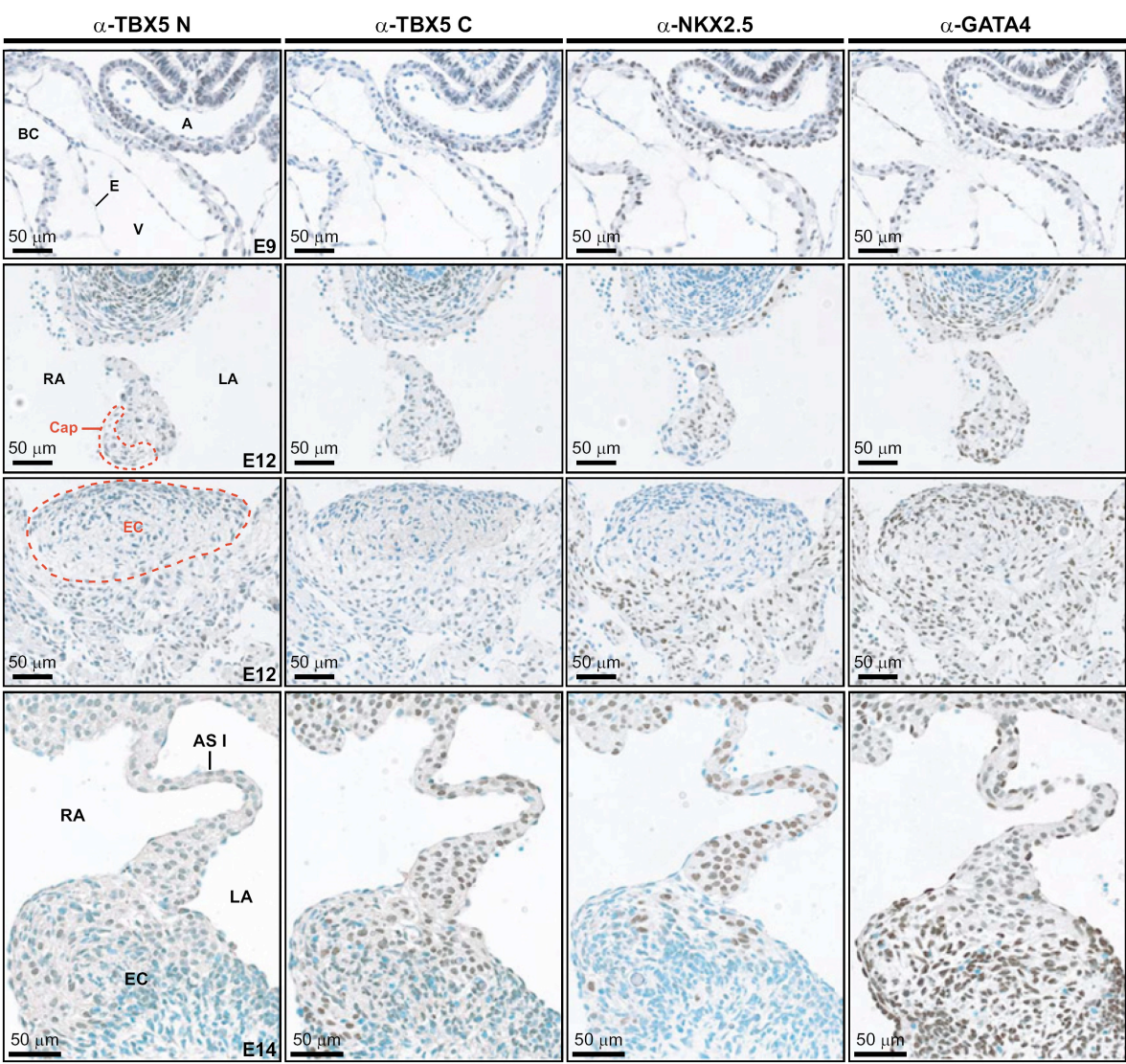
**Figure 3.2. Histologic analysis of secundum-type ASDs in *eTbx5*<sup>+/-</sup>, *eTbx5*<sup>-/-</sup> and CMV-Cre;*Tbx5*<sup>wt/flox</sup> mice.**



**Figure 3.3. Genetic interaction between *Tbx5* and *Gata4* and *Nos3*.**

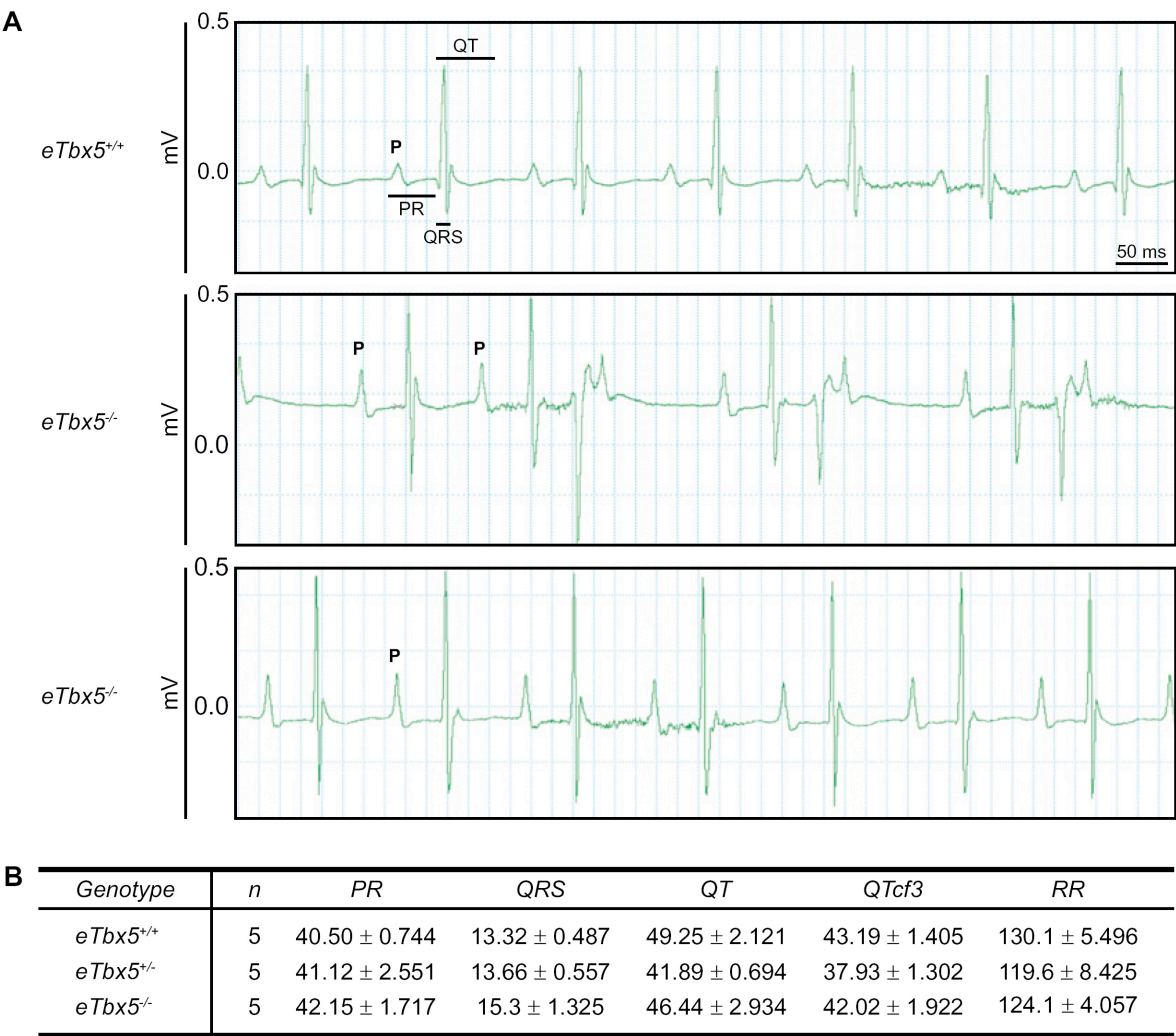


**Figure 3.4. Excessive apoptosis of the septum primum in *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice.**

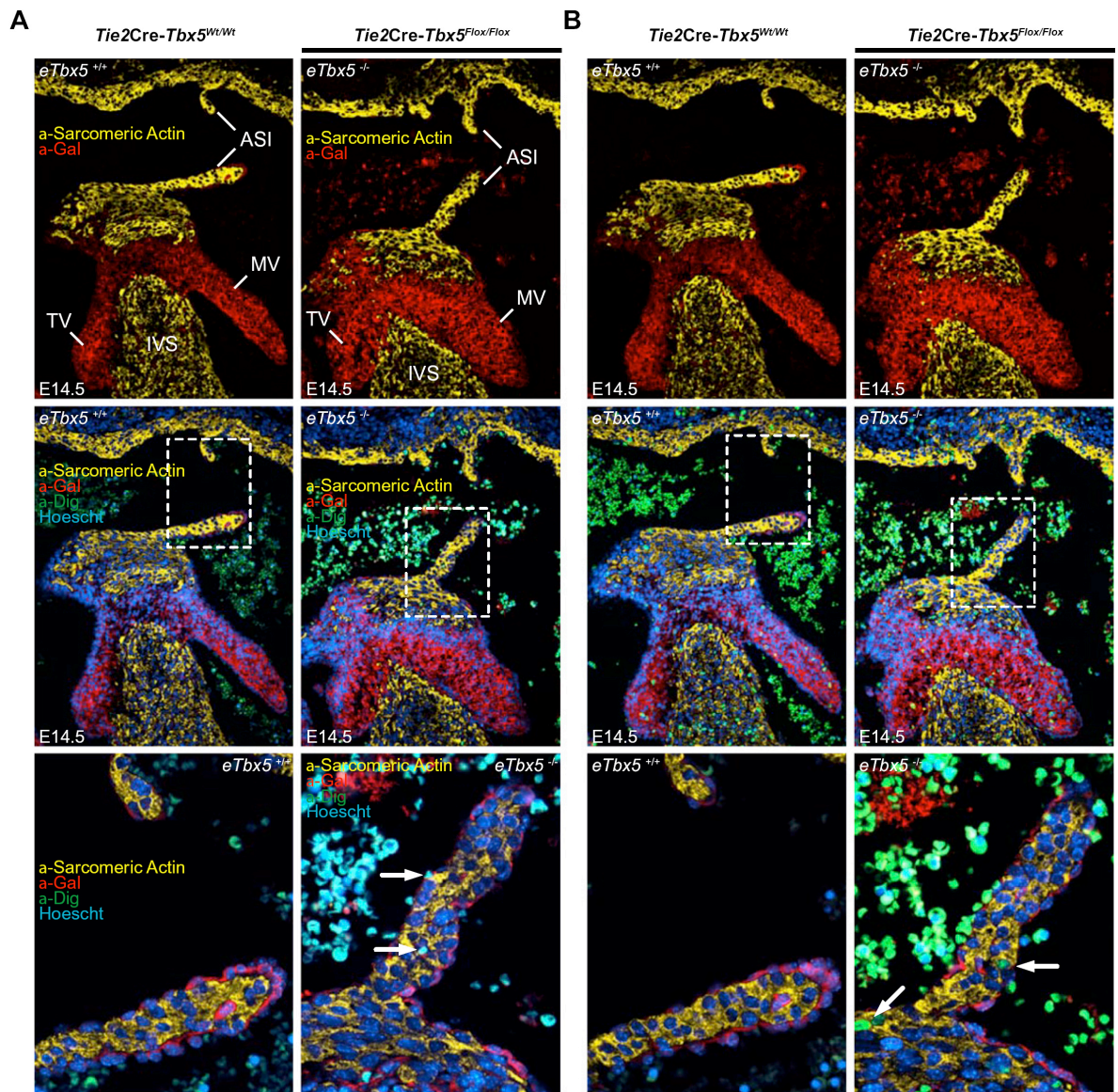


**Figure 3.S1. TBX5 expression in endocardial cells in late embryonic stages.**





**Figure 3.S2. ECG recording on aged (460 d) mice.**



**Figure 3.S3. Excessive apoptosis of the septum primum in *eTbx5<sup>-/-</sup>* mice.**

# **Chapitre 4. Phylogenetic footprinting identifies novel chamber-specific cardiac enhancers within the *Nppb/Nppa* locus. (Soumis).**

**Romain O. Georges<sup>1,2</sup>, Chantal Lefebvre<sup>1</sup>, Nathalie Bouchard<sup>1</sup>, and Mona Nemer<sup>1,2,3,\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Cardiac Growth and Differentiation, Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), 110, avenue des Pins Ouest, Montréal (Québec) H2W 1R7  
CANADA

<sup>2</sup>Programme de biologie moléculaire, Université de Montréal, C.P. 6127, succ. Centre-Ville, Montréal, QC, H3C 3J7, CANADA

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, Microbiology and Immunology, University of Ottawa, 550 Cumberland (246), Ottawa, ON, K1N 6N5, CANADA

**\*Corresponding Author:** Dr Mona Nemer Department of Biochemistry, Microbiology and Immunology, University of Ottawa, 550 Cumberland (246), Ottawa, ON, K1N 6N5, CANADA. Tel.: 613-562-5270 / Fax: 613-562-5271.

## 4.1 Contributions

**Georges Romain:** J'ai effectué l'analyse bio-informatique afin de comparer le locus *Nppb/Nppa* de différentes espèces de mammifères (humain, souris, rat) et d'identifier des modules enrichis en éléments de liaison à l'ADN de facteurs de transcription (enhancers potentiels). J'ai également réalisé les préparations des transgènes pour micro-injection (avec l'aide de **Chantal Lefebvre**) ainsi que les dissections des mères gestantes (avec l'aide de **Nathalie Bouchard**) afin de récupérer les embryons transgéniques, les colorations X-gal des embryons pour analyser le profil d'expression des différents transgènes, les expériences d'immuno-précipitation de la chromatine (ChIP), des transfections, et des EMSAs afin de mesurer le recrutement de différents facteurs de transcription sur les enhancers de *Nppb/Nppa*. **Mona Nemer** et moi avons analysé les résultats et collaboré à l'écriture du manuscrit.

Ce manuscrit a été soumis dans Genome Research.



## 4.2 Abstract

The *Nppa* and *Nppb* genes, which encode the heart major secretory peptides, are exquisitely regulated spatially and temporally. The two genes are also chromosomally linked and coordinately regulated across species, raising the possibility for the existence of common *cis*-regulatory sequences within their locus. We have used a phylogenetic footprinting approach to identify novel *cis*-regulatory modules (CRMs) within the *Nppb/Nppa* locus. Three putative enhancers with highly conserved clusters of ubiquitous and cardiac-specific transcription factors binding motifs were mapped. When tested in cultured cells, three displayed cardiac specific activity. *In vivo*, each module was able to target a *LacZ* transgene specifically to the ventricles in an overlapping as well as complementary manner to that obtained with the proximal *Nppa* promoter-controlled transgene. Thus, the overall expression pattern of the combined activities of these enhancers and the *Nppa* promoter recapitulated the exact endogenous *Nppa* expression during cardiogenesis. The overlapping transcriptional activities of these CRMs in the left ventricle may be required to achieve the proper quantitative chamber specific transcriptional readout during heart development. Finally, it was confirmed that divergent combinatorial transcription factors complexes are recruited to these three enhancers. Together the results identify novel chamber specific cardiac enhancers and further corroborate the likelihood that *Nppb/Nppa* expression is fine-tuned in the left ventricle through the integration within distinct regulatory modules of different developmental inputs.

**Keywords:** Heart Development, Transcription Regulation, GATA4, *Tbx5*, Cardiac Natriuretic Peptides

### 4.3 Introduction

Cardiogenesis and heart remodelling are orchestrated by gene regulatory networks, which are composed of circuits of transcription factors and signalling molecules. Genomic *cis*-regulatory modules (CRMs), including enhancers and silencers, integrate the combinatorial activities of transcription factors and hence govern spatio-temporal gene expression.

*Nppa* and *Nppb* are among the earliest markers of heart development and their re-expression in adult ventricular myocardium is a hallmark of cardiac hypertrophy (Houweling, van Borren, Moorman, and Christoffels 2005). These genes encode respectively the atrial natriuretic factor (ANF) and the brain natriuretic peptide (BNP), the heart major secretory hormones, which play a plethora of physiological roles in the modulation of cardiovascular function. Both ANF and BNP are anti-hypertensive cardioprotective hormones with potent diuretic, natriuretic, and vasodilator (hypotensive) activities crucial for the regulation of blood pressure and volume (Saito 2010). They also exhibit anti-mitogenic and cardiovascular growth-suppressing properties (Holtwick, van Eickels, Skryabin, Baba, Bubikat, Begrow, Schneider, Garbers *et al.* 2003; Kapoun, Liang, O'Young, Damm, Quon, White, Munson, Lam *et al.* 2004). The regulation of these cardiac hormones by a variety of regulatory networks controlling cardiovascular homeostasis has led to numerous thorough analysis of their transcriptional regulation and the successful identification of key transcription factors that regulate cardiac gene expression and heart development (Grepin, Dagnino, Robitaille, Haberstroh, Antakly, and Nemer 1994; Nemer 2008).

Several studies have addressed transcriptional regulation of *Nppa* resulting in the localization of several CRMs controlling basal and inducible transcription. The proximal promoter of *Nppa* (-0.7 kbp) was shown to recapitulate the atrial and ventricular developmental expression pattern of *Nppa* both *in vivo* and *in vitro* (Argentin, Ardati, Tremblay, Lihmann, Robitaille, Drouin, and Nemer 1994; Durocher, Chen, Ardati, Schwartz, and Nemer 1996a). This promoter fragment is also responsive to hormonal and mechanical stimuli in cardiomyocyte primary cell

cultures and has been used as a model to decipher signalling pathways regulating cardiac gene expression (Debrus, Sadzot-Delvaux, Nikkels, Piette, and Rentier 1995; Morin, Paradis, Aries, and Nemer 2001). Importantly, the use of this *Nppa* promoter allowed the characterization of many transcription factors, such as NKX2.5 (Durocher, Chen, Ardati, Schwartz, and Nemer 1996b; Durocher, Charron, Warren, Schwartz, and Nemer 1997), GATA4 (Grepin, Dagnino, Robitaille, Haberstroh, Antakly, and Nemer 1994), and TBX5 (Bruneau, Nemer, Schmitt, Charron, Robitaille, Caron, Conner, Gessler *et al.* 2001), which cooperatively control *Nppa* expression; studies in different organisms showed that such proteins play critical and evolutionary conserved roles in heart development. However, this proximal promoter is insufficient for recapitulating transcriptional upregulation of *Nppa* in hypertrophic or pressure overloaded hearts *in vivo* (Knowlton, Rockman, Itani, Vovan, Seidman, and Chien 1995; Horsthuis, Houweling, Habets, de Lange, el, Clout, Moorman, and Christoffels 2008), thus suggesting the existence of additional CRM residing outside this proximal promoter domain. *Nppb* gene regulatory domains have been less extensively studied. For instance, a short 135 bp proximal region was found to be sufficient for maximal cardiac expression in cultured cells (Grepin, Dagnino, Robitaille, Haberstroh, Antakly, and Nemer 1994), whereas a -408 to +100 bp fragment of the human *NPPB* gene was suggested to modulate the majority of its basal and cardiac-specific expression *in vivo* (He and LaPointe 1999). Longer sequences are required to restrict expression to the heart both *in vivo* and *in vitro* (Grépin, Dagnino, Robitaille, Haberstroh, Antakly, and Nemer 1994). Thus, besides the *cis*-acting elements (AP-1 like, YY1, GATA, CCAC, and MCAT) localized in the *Nppb* proximal promoter between -127 to -80 bp that contribute greatly to the basal and inducible regulation of *Nppb* (Grepin, Dagnino, Robitaille, Haberstroh, Antakly, and Nemer 1994; LaPointe, Wu, Garami, Yang, and Gardner 1996; Thuerauf and Glembotski 1997; Bhalla, Robitaille, and Nemer 2001; Marttila, Hautala, Paradis, Toth, Vuolteenaho, Nemer, and Ruskoaho 2001; Lavalley, Andelfinger, Nadeau, Lefebvre, Nemer, Horb, and Nemer 2006), more distal activator and repressor *cis*-regulatory elements within the -2.5 kbp region seem to be needed for proper transcriptional regulation.

While *Nppb* expression is sometimes discoordinated from that of *Nppa*, such as during pro-inflammatory cytokines exposure (Masters, Davies, Veinot, Hendry, Smith, and de Bold 1999; He and LaPointe 1999; tomaru Ki, Arai, Yokoyama, Aihara, Sekiguchi Ki, Tanaka, Nagai, and Kurabayashi 2002; Ma, Ogawa, and de Bold 2004; Meirovich, Veinot, de Bold, Haddad, Davies, Masters, Hendry, and de Bold 2008), the two natriuretic peptide genes are most often co-regulated spatially, developmentally and in response to hormonal or hemodynamic stimuli. Surprisingly, the proximal promoter architectures of *Nppa* and *Nppb* are clearly divergent, suggesting that other yet unidentified *cis*-regulatory elements may contribute to the coordinate spatio-temporal expression pattern of the two genes. A genome-wide association analysis in humans substantiated the possibility of coordinated transcriptional expression of these two genes conceivably through shared *cis*-regulatory elements by revealing that two SNPs within the *Nppb/Nppa* locus were associated with higher circulating concentrations of both hormones and lower systolic/diastolic blood pressure (Newton-Cheh, Larson, Vasan, Levy, Bloch, Surti, Guiducci, Kathiresan *et al.* 2009). Furthermore, the close proximity in tandem of *Nppb/Nppa* on chromosome 1, 4, or 5 in human, mouse and rat respectively, as well as their coordinated transcriptional regulation during embryogenesis and in post-natal hearts raise the intriguing possibility for the existence of common CRMs that co-regulate the transcription of both genes. This would be analogous to the locus control region (LCR) of the  $\beta$ -globin locus in which distal *cis*-regulatory elements modulate the stage-specific expression of  $\beta$ -globin genes (Palstra 2009).

Given the evolutionarily conservation of gene regulatory networks and the similar transcriptional regulation of orthologous genes, we attempted to decipher the topography of the CRMs within the *Nppb/Nppa* locus using a comparative genomic approach known as phylogenetic footprinting. We therefore exploited the phylogenetic conservation of the *Nppb/Nppa* locus across multiple species to identify novel biologically relevant CRMs governing the cardiac-specific expression of *Nppa* and *Nppb*. This approach successfully led to the identification of three novel remote CRMs embedded in the *Nppb/Nppa* locus that direct spatial specific expression of these genes during cardiogenesis.

## 4.4 Results

### Localization by phylogenetic footprinting of distal putative *regulatory* modules

The conservation of the *Nppb/Nppa* expression patterns among different species is suggestive of the presence of evolutionary conserved regulatory regions along the *Nppb/Nppa* locus. To identify them, we undertook phylogenetic footprinting, a computational technique often used in comparative genomics to detect evolutionarily conserved regions (ECRs) enriched in transcription factor binding sites (TFBSs).

First, in order to detect ECRs, we generated local multiple-sequence alignments of the syntenic region of the *Nppb/Nppa* locus collected from three different mammalian species (human, mouse, rat) and covering the region from the 5' end of *Plod1* to the 3' end of *Cln6* neighboring genes (region spanning from -49.7 kbp to +21.3 kbp relative to the mouse *Nppb* transcription start site) (Fig. 1a). These three species were originally selected on account of the quality of their genome assemblies and the low frequency of sequence gaps in the *Nppb/Nppa* locus. The isolation of the syntenic regions was performed using the ECR browser (<http://ecrbrowser.dcode.org>) and the UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>), whereas their alignment was computed by means of the web-based Mulan multiple-sequence local alignments software (<http://mulan.dcode.org/>) so as to detect ECRs. Then, in order to sift through the multitude of ECRs and uncover those with potential regulatory function, the multiTF program (<http://multitf.dcode.org>), which is dynamically interconnected to Mulan, was utilized to identify evolutionarily conserved TFBSs clustered within some of the ECRs present in all three aligned orthologous sequences. This method was first used with the mouse and rat *Nppb/Nppa* locus, but was uninformative since these two species are too closely related. However, when a third more distant mammalian species (human) was added, this approach successfully predicted the existence of 10 intergenic ECRs between *2510039O18Rik* and *Nppb*, 3 ECRs between *Nppa* and *Nppb*, and 2 ECRs between *Nppa* and *Cln6* (Fig. 1a). The

results were obtained when the “ECR length” and “ECR sequence similarity” parameters were respectively adjusted to  $\geq 100$  bp and to  $\geq 60\%$  of identity. A more stringent conservation filtering ( $\geq 70\%$  identity) in the local alignments only reduced the number of ECRs to 8 between *2510039O18Rik* and *Nppb*, 0 ECR between *Nppa* and *Nppb*, and 2 between *Nppa* and *Clcn6* (data not shown).

To further ascertain their relevance, it was crucial to analyze the presence of evolutionary conserved TFBSs within these ECRs. The multiTF program successfully discriminated four separate ECRs upstream of the *Nppb* gene, named US1 to US4 (US: Upstream Sequence), which contained clusters of evolutionary conserved TFBSs (Fig. 1a). The four ECRs are relatively close to one another, extending from -25.3 kbp to -16.2 kbp relative to the mouse *Nppb* transcriptional start site (-40.2 kbp to -31.1 kbp relative to *Nppa* transcriptional start site) (Fig. 1a). While the mouse and rat four ECRs are very similar, three of the human ECRs exhibit slight differences. Human US1 is subdivided into two fragments, named US1a and US1b, separated by a non-conserved sequence of 1.4 kb. In addition, human US3 and US4 are fused together, whereas mouse and rat US3-US4 ECRs are respectively segregated by 3.2 kb and 2.7 kb. Albeit the small divergences in ECRs arrangements among these distant species, the vast majority of eutherians (human, chimpanzee, orangutan, rhesus macaque, gorilla, gibbon, marmoset, horse, cow, sheep, pig, dog, cat, mouse, rat, guinea pig ...) share these four ECRs, whereas metatherians (marsupials) such as the opossum (*Monodelphis domestica*) retain only two of these ECRs (US2 and US4). The incomplete genome draft of the Platypus (*Ornithorhynchus anatinus*), which is the only representative species of the prototherians in genome databases, hindered the detection of any of these ECRs in this last mammalian division. Interestingly, birds (chicken, turkey, and zebra finch) only possess a portion of two of these ECRs (US2 and US4) (Supplemental Data S1).

Further analysis showed that all these distant putative CRMs, ranging from 453 bp to 972 bp in length in the mouse, are enriched in binding sites for ubiquitous as well as cardiac-specific transcription factors (NKE motif in US1; TBE, SRE, and MEF2 motifs in US2; GATA motifs in US4) (Fig. 1b). Whereas all four CRMs are

characterized by the co-occurrence of diverse TFBSs (heterotypic transcription factors clusters), US2, US3, and US4 also exhibit the presence of overlapping TFBSs as well as homotypic clusters (recurrent binding sites for the same transcription factor) which are thought to be critical for enhancer function (Gotea, Visel, Westlund, Nobrega, Pennacchio, and Ovcharenko 2010). For instance, US2 displays 2-3 binding sites for several TFs including ETS, MEF2, and TBX. Likewise, US3 contains three E-box (two being identical to the consensus MycMax motif), two ETS, two HBS (HIF-1 binding site) and two TCF4 motifs, whereas US4 possesses two GATA, IKAROS, MARE half-sites (Maf Recognition Element), and motifs (Fig. 1b). It is noteworthy that, aside from Meis and Tcf4 motifs shared by US2, US3, and US4, the binding motifs composition is clearly divergent among all four ECRs, suggesting distinctive spatio-temporal activity. In conclusion, the phylogenetic footprinting strategy localized across the three mammalian species four distal putative *cis*-regulatory regions with evolutionary conserved architectures of binding motifs suggestive of functional regulatory conservation.

### ***Nppb/Nppa* CRMs are transcriptionally active**

To test the transcriptional activity of the ECRs, transient transactivation assays were carried out in multiple cell lines. The mouse ECRs were cloned into the pXP2 reporter plasmid (Fig 1b), upstream of the *Nppa* minimal promoter (-54 bp), which contains the TATA box but exhibits no activity in cardiac and heterologous cell lines (Argentin, Ardati, Tremblay, Lihmann, Robitaille, Drouin, and Nemer 1994; Durocher and Nemer 1998). Each one of these heterologous constructs exhibited greater basal transcriptional activity in ventricular cardiomyocytes primary cultures than the control minimal promoter (Fig. 2a). US1, US2 and US4 had 3 to 4 fold higher activity than the minimal promoter, whereas US3 activity exceeded 12 fold. In heterologous cell lines, only US2 exhibited activation in NIH3T3 cells equivalent to the one obtained in cardiomyocytes, while US3 displayed a modest activity in C2C12 cells that was 3-fold lower than in cardiomyocytes (Fig. 2a).

The elevated basal activity of these ECRs in neonate cardiomyocytes, prompted us to test their transcriptional response to known *Nppb/Nppa* inducers. The results clearly demonstrated induction of the transcriptional activity of three

(US2, US3, and US4) of the four ECRs stimulated with endothelin-1 or phenylephrine (Fig. 2b).

### **Distinct transcription factor complexes regulation to the *Nppb/Nppa* CRMs**

Given the transcriptional activity of the three CRMs, it was interesting to determine their ability to recruit relevant cardiac-specific transcription factors known to contribute to *Nppa* and *Nppb* transcription. These include TBX5, TBX20, GATA4, and SRF that are well known activators of endogenous *Nppa* and *Nppb* genes (Charron, Paradis, Bronchain, Nemer, and Nemer 1999; Morin, Paradis, Aries, and Nemer 2001; Bruneau, Nemer, Schmitt, Charron, Robitaille, Caron, Conner, Gessler *et al.* 2001; Parlakian, Tuil, Hamard, Tavernier, Hentzen, Concordet, Paulin, Li *et al.* 2004; Takeuchi, Mileikovskaia, Koshiba-Takeuchi, Heidt, Mori, Arruda, Gertsenstein, Georges *et al.* 2005) and for which putative binding sites are found on some CRMs (Fig. 1b). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed to assess the *in vivo* interactions of these cardiac transcription factors with the different CRMs using neonate primary cardiomyocyte cultures. As control recruitment to the *Nppa* and *Nppb* proximal promoters was carried out (Fig. 3a). Only TBX5 was enriched on US3 (Fig. 3b). Moreover, while absolute fold enrichment was variable across experiments, relative levels of enrichment was highly reproducible with highest enrichment for TBX5 and GATA4 detected on US4 (Fig. 3b and 3c). Whereas TBX5, TBX20 and GATA4 interacted with US4 (Fig. 3b and 3c). US2 on the other hand was able to recruit both TBX5 and SRF (Fig. 3b and Fig. 5a).

Interestingly, only some of the conserved TFBSs were able to interact with their putative corresponding transcription factor *in vitro*. For instance, our *in silico* analysis identified two putative TBE sites (TBE1 and TBE2) in the US2 module (Fig. 4c), but only TBE2 could bind TBX5 (Fig. 4a and 4b). The *in silico* TFBSs prediction also underestimated the category of transcription factors that can interact with each CRM. Thus, while some cardiac transcription factors were able to directly bind to their predicted cognate TFBSs, others seemed indirectly recruited as their presence was detected by ChIPs but no matching TFBS could be identified. For instance, electrophoretic mobility-shift assays (EMSAs) confirmed



the capacity of TBX5 (Fig. 4a) and SRF (Fig. 5c) to directly interact with TBE2 and SRE sites of the US2 module, respectively. In contrast, US3 and US4 modules recruited T-box factors although they do not bear any conserved TBE sites (Fig. 3b and 3c), suggesting that the T-box factors may be recruited to DNA via other DNA-bound proteins or via non-consensus DNA TBE elements. We also tested the ability of these and other cardiac transcription factors for which conserved putative binding sites were identified to regulate CRMs activity. Activation of the various modules by GATA4 and TBX5 was consistent with ChIP results: TBX5 dose dependently activated all three modules tested with the highest activation observed for US4. Similarly, only US4 which was bound *in vivo* by GATA4 (Fig. 3) was activated by cotransfection with GATA4 expression vectors (data not shown). Altogether, the results confirmed the capacity of the three CRMs to differentially recruit cardiac transcription factors, and to direct regional specific expression within heart ventricles.

### **Distinct chamber specificity of the three long-range *Nppb/Nppa* CRMs**

To confirm the function of these putative CRMs *in vivo*, the activity of each element was assessed by generating transient transgenic mice. For this, the ECR-*Nppa* promoter constructs were cloned in the pWHERE plasmid upstream of the  $\beta$ -galactosidase gene (*LacZ* CpG-free reporter gene), which is inserted between two murine H19 insulator elements in order to shield the transgene from chromosomal position integration effects. This strategy was used to circumvent potential positive or negative influence(s) at the genomic integration site and therefore allow a uniform expression of the transgene. We initially generated transient transgenic mice to assess the potential enhancer activity of these *cis*-regulatory elements at embryonic day 12.5 (E12.5) since ventricular ANF mRNA reaches its peak at this age (Cameron, Aitken, Ellmers, Kennedy, and Espiner 1996). An *Nppa* promoter (-697 bp) -*LacZ* construct was used as a control since previous studies have shown that the region between -697 bp and -60 bp contains *cis*-regulatory sequences that can mediate prenatal cardiac-specific expression of *Nppa* (Argentin, Ardati, Tremblay, Lihmann, Robitaille, Drouin, and Nemer 1994; Knowlton, Rockman, Itani, Vovan, Seidman, and Chien 1995; Habets, Moorman, Clout, van Roon,

Lingbeek, van Lohuizen, Campione, and Christoffels 2002; Houweling, van Borren, Moorman, and Christoffels 2005; Horsthuis, Houweling, Habets, de Lange, el, Clout, Moorman, and Christoffels 2008).

The systematic analysis of whole mount X-gal staining in F0 transient transgenic mouse embryos rapidly revealed that out of the four clusters of TFBSs identified, three exhibited cardiac activity at E12.5. The consistency of the expression pattern observed for each transgene. From all the positive embryos collected ( $\approx 28\%$ ), approximately 50 % expressed the *LacZ* reporter gene (Fig. 6a) and only 3 embryos showed ectopic *LacZ* expression. In 2 embryos presenting an aberrant *LacZ* ectopic expression, the  $\beta$ -galactosidase activity was detected, aside from the normal expression in the heart, in two symmetrical regions of the brain in an US2-*LacZ* embryo, and in a single small patch of cells within the two fore/hindlimbs in an *Nppa*-*LacZ* embryo (Fig 3A). The third embryo, with an US4-*LacZ* transgene, displayed *LacZ* expression within the eyes but not in the heart (Fig 3A). The cardiac expression pattern exhibited by the *Nppa* promoter and each one of the three CRMs (US2, US3, and US4) constructs was reproducible albeit with fluctuating relative  $\beta$ -galactosidase expression level (likely due to variation in transgene copy number).

The *Nppa* promoter (-697 bp) consistently provided a robust atrial and a modest left ventricular activity (Fig. 6d and 7a) as previously reported. Since endogenous *Nppa* is also expressed in the embryonic right ventricle, this finding indicates that the *Nppa* proximal promoter lacks the complete *cis*-regulatory information for embryonic ventricular activity. Interestingly, this *Nppa* promoter consistently exhibited activity in the brain and the spinal cord (Fig. 6b and 6c), which was not previously reported although these sites are known *Nppa* expressing cells and tissues (Langub, Jr., Watson, Jr., and Herman 1995; Cameron, Aitken, Ellmers, Kennedy, and Espiner 1996).

Except for the most distal module, US1, which was devoid of enhancer function in E12.5 embryos, all other ECRs displayed unique cardiac expression patterns. US2 activity was consistently restricted to the left ventricle and to scarcely distributed cells of the right atria (Fig. 7b). In contrast, US4 module drove robust

*LacZ* expression to the left ventricle, interventricular septum (IVS) and to few cells of the right ventricle, close to the IVS (Fig. 7d). Finally, US3 targeted robust expression of the reporter gene to both ventricles, consistent with its strong transcriptional activity in ventricular primary cultures (Fig. 7c); interestingly, the stronger *LacZ* expression in the left ventricle relative to the right ventricle (Fig. 7c) mirrors endogenous *Nppa* and *Nppb* ventricular distribution. Thus, in addition to their overlapping expression pattern in certain territories of the left ventricle, the 3 CRMs displayed distinct expression profiles which may correlate with their distinct repertoire of binding motifs. It is noteworthy that when combined, the expression pattern of US2, US3, and US4 recapitulates the ventricular-specific embryonic expression of *Nppa* and *Nppb*.

## 4.5 Discussion

The crucial roles of the cardiac hormones *Nppa* and *Nppb* in a myriad of regulatory subnetworks controlling cardiovascular homeostasis has led since three decades to the study of their transcriptional regulation during cardiogenesis and heart disease. A step towards the unravelling of the genomic *cis*-regulatory code guiding the spatio-temporal expression of *Nppa* and *Nppb* genes in the heart during development, normal function or diseased state, is to determine the topography of the CRMs within the extensive *Nppb/Nppa* locus. Starting with the assumption that orthologous genes are generally similarly regulated, which was supported in the case of *Nppb/Nppa* by the striking conservation of their cardiac expression patterns among different mammal species, we realized a phylogenetic footprinting to predict the novel biologically relevant CRMs. This strategy of cross-species comparison successfully led to the localization of clusters of TFBSs embedded within four ECRs of the *Nppb/Nppa* locus. These putative *cis*-regulatory elements were inferred from the clustering of interspecies conserved TFBSs for cardiac-specific as well as ubiquitous transcription factors.

The high accuracy of CRM prediction was achieved by the cross-species comparison of the syntenic region of *Nppb/Nppa* locus collected from three mammal species. The choice of phylogenetically distant mammal species was to minimize TFBSs false positives, and therefore to correctly annotate biologically relevant CRMs. Indeed, the inherent shortness and degeneracy of TFBSs would have led to high error rates in a genome-wide binding motif scan from a single species. The down side of this phylogenetic footprinting strategy is that we possibly missed species-specific regulatory elements, which evolved independently in each one of the three mammal lineage studied. It is also noteworthy that the majority of the detected ECRs in this study did not qualify as putative CRMs during the computational stage, because of the absence or paucity of evolutionary conserved TFBSs in these ECRs. However, this could be a drawback of the phylogenetic footprinting strategy since it relies on the detection of TFBSs which are insofar scarcely ascertained. In fact, the TFBSs of only approximately one-sixth of all

transcription factors have been experimentally determined up to now (Schroder, Eichner, Supper, Eichner, Wanke, Henneges, and Zell 2010).

The hypothesis that these ECRs possessed an enhancer capability was further strengthened by the *in silico* approach, which revealed the clustering and overlapping of diverse conserved TFBSs in all four modules as well as the presence of multiple homotypic clusters of transcription factor binding sites (HCTs) in US2, US3, and US4 modules. Indeed, TFBSs clustering is a crucial characteristic of enhancers, and the presence of HCTs have been detected in many developmental enhancers (Gotea, Visel, Westlund, Nobrega, Pennacchio, and Ovcharenko 2010). The co-occurrence of multiple HCTs which may favor robustness against mutations and facilitate transcription factor recruitment and cooperative interactions (Segal, Raveh-Sadka, Schroeder, Unnerstall, and Gaul 2008). Since the co-occurrence of heterotypic TFBSs also favors transcription factor combinatorial interactions, we validated several protein-DNA interactions *in vivo* through ChIP experiments. This analysis confirmed that a variety of combinatorial interactions of ubiquitous and cardiac-specific transcription factors could occur in ventricular cardiomyocytes on the three cardiac-specific CRMs (US2, US3, and US4). The phylogenetic footprinting strategy therefore precisely localized across the three mammalian species four distal putative CRMs with evolutionary conserved architectures of binding motifs, three of which are bound *in vivo* by combinatorial regulatory complexes.

Out of the four ECRs tested in transient transgenic experiments, one (US1 module) did not exhibit any enhancer activity at E12.5. US1 may lack any enhancer activity *in vivo*; this possibility is supported by the fact that US1 is the only one of the four putative CRMs in which the TFBSs spacing is not conserved between muridae (587 bp and 638 bp in length in rat and mouse, respectively) and human (2109 bp in length) sequences. As a matter of fact, with the exception of mice and rats (muridae family), US1a and US1b elements are separated by a non-conserved sequence of approximately 1 kbp in every mammal tested. US1 module is also the only one of the four putative CRMs without any HCT and comprises only one cluster of overlapping heterotypic TFBSs, whereas US2 and US3 modules have

seven and US4 has four. Indeed, the clustering and overlapping of TFBSs tend to be the consequences of the evolutionary selection of TFBSs composition within enhancers (Lusk and Eisen 2010). The absence of HCT as well as the paucity of highly clustered and/or overlapping heterotypic TFBSs within the US1 module could indicate that this ECR has no *cis*-regulatory function. However, since the transient transgenic mice were only tested at E12.5, we cannot exclude the possibility that US1 may be active at other time points.

The transient transgenic experiments revealed that the three other TFBSs clusters (US2, US3, and US4) regulate the *LacZ* reporter gene in a specific spatial manner in the heart, suggesting they may contribute to regulate *Nppb/Nppa* transcription in specific regions of the heart. Although the TFBSs composition was clearly divergent among these three active CRMs, suggesting distinctive transcriptional regulatory functions, they displayed overlapping transcriptional activity in the left ventricle. This functional redundancy could be required to reach the proper quantitative gene expression readout in the left ventricle from the integration of the transcriptional outputs of the three CRMs. Thus, the correct transcriptional rates in the left ventricle of *Nppb/Nppa* would derive from the computation of the transcriptional output of all the partially redundant CRMs. Enhancers with overlapping expression patterns have also been referred to as shadow enhancers, which contribute, by their redundant functions, to gene expression robustness against environmental perturbations and/or genetic variability (Frankel, Davis, Vargas, Wang, Payre, and Stern 2010; Perry, Boettiger, Bothma, and Levine 2010). Alternatively, the TFBS composition specificity of each CRM could be needed to integrate different mechanical and/or neurohumoral inputs occurring in the left ventricle during physiological or pathological conditions at defined developmental time points. Left ventricular specificity could be acquired through the direct or indirect recruitment of TBX5 to all three CRMs as well as the *Nppa* and *Nppb* promoters. Interestingly, the lack of conserved TBE sites in US3 and US4 does not impede the recruitment of TBX5. The strong similarity of the US3 expression pattern with the left/right ventricular gradient of TBX5 expression, as well as the recruitment of this transcription factor to the US3 module, suggest that TBX5 targets US3 to both ventricles. Besides the recognized role of *Tbx5* in

the regulation of *Nppa*, as revealed by the lack of *Nppa* expression in *Tbx5*<sup>-/-</sup> mice (Bruneau, Nemer, Schmitt, Charron, Robitaille, Caron, Conner, Gessler *et al.* 2001), *Tbx5* could also allow the fine-tuning of *Nppb/Nppa* expression in ventricles through the arrangement of specific combinatorial transcription factors complexes on the different CRMs.

From an evolutionary perspective, phylogenetic analysis show that among all the vertebrates so far investigated only birds retain two CRMs (US2 and US4), while none of the identified CRMs seem to be present in other vertebrates (fishes, reptiles, and amphibians). Although the two avian CRMs are strongly conserved (> 72% identity) between the three available species (chicken, turkey, and zebra finch), the divergence with mammals is strong (only 45% identity). Actually, phylogenetic analysis demonstrated that the genomic region upstream of the *Nppb* gene has extensively diverged after the branching of the amniotes, leading to the loss of CNP3 and RNP in mammals (Trajanovska, Inoue, Takei, and Donald 2007), and most probably the positive selection of the three CRMs identified. Thus, besides the three natriuretic peptide genes (CNP3, RNP, and *Nppb*) tandemly arranged on the chicken chromosome 21 following the loss of *Nppa* (Trajanovska, Inoue, Takei, and Donald 2007), the genomic region encompassing the three CRMs probably did not emulate the extensive adaptation that occurred in mammals, and hence only retained two genomic sequences distinct from the mammalian US2 and US4 modules, upstream of the CNP3 gene. Therefore, the three identified CRMs seem to be specific mammals' adaptations, and suggest that the poorly conserved avian US2 and US4 modules do not possess any enhancer function. An argument for this hypothesis is that the cardiac expression patterns of the three natriuretic genes in chicken are very different (Houweling, Somi, Massink, Groenen, Moorman, and Christoffels 2005; Trajanovska, Inoue, Takei, and Donald 2007), indicating that these genes are regulated individually and most probably do not share any *cis*-regulatory elements. This would explain the high divergence of US2 and US4 between avian and mammal species assuming that the region encompassing these CRMs was not under selective pressure in birds.

Interestingly, the genomic region encompassing the three identified CRMs has rapidly evolved within the Mammalia class, as illustrated by the specificity of the US3 module to the Eutheria infraclass. Indeed, based on the opossum genome, US3 seems to be absent in metatherians, whereas US2 and US4 are almost as highly conserved between the eutherian species and the opossum than within the Eutheria infraclass itself. Beyond the *cis*-regulatory functions of US3 during cardiogenesis, it is tempting to speculate that this enhancer has evolved in conjunction with the necessary female cardiovascular system adaptation to the long *in utero* gestation specific to eutherians.

It is noteworthy that a recent study (He, Kong, Ma, and Pu 2011) using high-throughput ChIP-seq analysis of the chromatin co-occupancy by multiple transcription factors in atrial HL1 cells (He, Kong, Ma, and Pu 2011) confirmed our ChIP results by establishing the recruitment of SRF to US2, GATA4 to US4, and TBX5 to US3, US4, and a region only 316 bp upstream of US2.

In conclusion, the phylogenetic footprinting applied to the *Nppb/Nppa* locus successfully led to the identification of three biologically relevant CRMs capable of modulating *Nppb* and/or *Nppa* expression in the ventricles during cardiogenesis. The overall expression pattern resulting from these different CRMs complements the *Nppa* promoter-controlled expression profile, and could therefore recapitulate the exact endogenous *Nppa* cardiac expression. The functional redundancy of these CRMs in the left ventricle may be required to reach the proper quantitative transcriptional readout in this cardiac chamber. The divergent combinatorial transcription factors complexes on the three CRMs further suggests that the fine-tuning of *Nppb/Nppa* expression in the left ventricle ensues from the integration in each CRM of different developmental inputs emanating in the left ventricle during cardiogenesis. Lastly, the divergent arrangement of these CRMs and the potential presence of species-specific enhancers suggest that the *Nppb/Nppa* locus greatly evolved within the Eutheria infraclass, and needs to be thoroughly studied to completely understand the transcriptional regulation of these natriuretic genes in each mammalian species.



## 4.6 Materials and methods

### *In Silico* analysis

Isolation of the *Nppb/Nppa* syntenic genomic regions was realized using the UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>) and the ECR browser (<http://ecrbrowser.dcode.org>), whereas the multiple-sequence local alignments were performed using the Mulan algorithm available on the network server <http://mulan.dcode.org/>. Identification of the evolutionary conserved transcription factor binding sites (TFBSs) in all three aligned orthologous sequences was performed using the web-based multiTF software (<http://multitf.dcode.org>).

### DNA constructs

The conserved genomic regions identified by *in silico* analysis upstream from the murine *Nppb* gene (US1, US2, US3, and US4) were amplified by PCR from C57/Black6 mice genomic DNA, then coupled to the mouse *Nppa* minimal promoter (-54 bp to +94 bp relative to the transcriptional start site (TSS) of the *Mus musculus Nppa* mRNA) before being cloned in the multiple cloning site (MCS) of the pWHERE plasmid (InvivoGen). The minimal mouse *Nppa* promoter employed spanned from -54 bp to +94 bp (last nucleotide just prior to the ATG within the Kozak sequence of the *MmNppa* mRNA) and was ligated in 3' into the NcoI restriction site of the pWHERE plasmid which is overlapping the ATG of the *LacZ* CpG-free reporter gene. The pWHERE plasmid contains two murine H19 insulators flanking the *LacZ* cassette and therefore shielding the MCS + *LacZ*ΔCpGnls reporter gene. These same conserved regions were cloned upstream of the luciferase gene in pXP2 plasmid in order to conduct transient transactivation assays in cultured cells. The -697 bp rat *Nppa* promoter was also cloned into pWHERE to use as a control in transgenesis.

### Cell culture and transfections

Primary cultures of 4 days old rat ventricular cardiomyocytes were prepared, maintained in culture, and transfected as previously described. NIH3T3 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% charcoal-

stripped fetal bovine serum (FBS) and transfected once they reached a density of 50%. Transfections were performed by using the calcium phosphate method. The luciferase reporters (pXP2 plasmid) and the total amount of DNA were kept constant in all transfections by addition of the appropriate empty vector. The experiments were repeated at least 2 to 3 times in duplicate.

### **Generation of transgenic mice, genotyping**

Transgenic promoter- and CRM-reporter lines were generated by re-implanting in pseudo-pregnant B6C3F1 females the fertilized eggs immediately after microinjecting the highly purified linearized DNA constructs in their pronucleus. Transgenic mice were generated, bred and experimented on according to standard operating procedures approved by the IRCM Animal Care Committee, in conformity with the guidelines set by the Canadian Council on Animal Care. Genotyping was realized by PCR, and then the number of transgene copies in the positive transgenic lines was determined by QPCR using Qiagen QuantiTect SYBR green.

### **X-Gal staining**

Embryos or perfused hearts were fixed at 4°C in paraformaldehyde 4% (dissolved in PBS 1x) during an appropriate duration, proportional to the size of the embryo or tissue sample (usually 60 min. for embryos at E12.5 and adult hearts). The embryos were washed 4 times in a rinse buffer (100 mM phosphate buffer pH 7.5 + 2 mM MgCl<sub>2</sub> + 0.03% Triton X-100), then stained with a staining solution (rinse buffer + 5 mM potassium ferrocyanide + 5 mM potassium ferricyanide + 1 mg/ml X-Gal) up to 24 to 36 hours at 30°C. Finally, the embryos were washed in rinse buffer, fixed at 4°C in paraformaldehyde 4%, cryopreserved at -80°C in Tissue-Tek® O.C.T. compound (Sakura Finetek, USA) and then cut using a cryostat.

### **Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)**

Primary cultures of 4 days old rat ventricular cardiomyocytes were prepared as previously described (Argentin, Ardati, Tremblay, Lihmann, Robitaille, Drouin, and

Nemer 1994). Chromatin of  $10^7$  cells was cross-linked with 1% formaldehyde added directly to the culture medium for 5 min at room temperature. Cross-linking was stopped with a solution of PBS 1x + 125 mM glycine for 5 min, followed by the lysis of the cells in order to purify the nuclei. Sonicated chromatin was subjected to a pre-clear using protein A/G, and then immuno-precipitated overnight at 4°C with either rabbit  $\gamma$ -globulins (Sigma, G2018) as a control,  $\alpha$ -TBX5 (Georges, Nemer, Morin, Lefebvre, and Nemer 2008),  $\alpha$ -TBX20 (Takeuchi, Mileikovskaia, Koshiba-Takeuchi, Heidt, Mori, Arruda, Gertsenstein, Georges *et al.* 2005),  $\alpha$ -GATA4 (C-20X) (Santa cruz biotechnology, sc-1237 X),  $\alpha$ -NKX2.5 (N-19X) (Santa cruz biotechnology, sc-8697 X), or  $\alpha$ -SRF (G-20X) (Santa cruz biotechnology, sc-335 X) antibodies and precipitated 2 hours at 4°C using protein A/G PLUS-Agarose beads (Santa cruz biotechnology, sc-2003) saturated with tRNA. Beads were washed with solutions of increasing stringency (5 washes) before being rinse one last time with TE buffer 1x. De-cross-linked chromatin overnight at 65°C was followed by DNA purification using QIAquick columns according to the manufacturer's directives. Enrichment was assessed by QPCR with Qiagen QuantiTect SYBR green.

#### **4.7 Acknowledgements**

The authors are grateful to the transgenic core facility of the IRCM for the generation of transgenic mice and the core histology services for tissue sections.

#### **4.8 Sources of funding**

The work was funded by the Canadian Institutes of Health Research and the Canada Research Chairs Program.

#### 4.9 Reference List

1. Argentin, S., Ardati, A., Tremblay, S., Lihmann, I., Robitaille, L., Drouin, J., and Nemer, M. 1994. Developmental stage-specific regulation of atrial natriuretic factor gene transcription in cardiac cells. *Molecular and Cellular Biology* 14:777-790
2. Bhalla, S.S., Robitaille, L., and Nemer, M. 2001. Cooperative activation by GATA-4 and YY1 of the cardiac B-type natriuretic peptide promoter. *Journal of Biological Chemistry* 276:11439-11445
3. Bruneau, B.G., Nemer, G., Schmitt, J.P., Charron, F., Robitaille, L., Caron, S., Conner, D.A., Gessler, M., Nemer, M., et al. 2001. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* 106:709-721
4. Cameron, V.A., Aitken, G.D., Ellmers, L.J., Kennedy, M.A., and Espiner, E.A. 1996. The sites of gene expression of atrial, brain, and C-type natriuretic peptides in mouse fetal development: temporal changes in embryos and placenta. *Endocrinology* 137:817-824
5. Charron, F., Paradis, P., Bronchain, O., Nemer, G., and Nemer, M. 1999. Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression. *Molecular and Cellular Biology* 19:4355-4365
6. Debrus, S., Sadzot-Delvaux, C., Nikkels, A.F., Piette, J., and Rentier, B. 1995. Varicella-zoster virus gene 63 encodes an immediate-early protein that is abundantly expressed during latency. *Journal of Virology* 69:3240-3245
7. Durocher, D., Charron, F., Warren, R., Schwartz, R.J., and Nemer, M. 1997. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO Journal* 16:5687-5696

8. Durocher, D., Chen, C.Y., Ardati, A., Schwartz, R.J., and Nemer, M. 1996a. The ANF promoter is a downstream target for Nkx-2.5 in the myocardium. *Molecular and Cellular Biology* 16:4648-4655
9. Durocher, D., Chen, C.Y., Ardati, A., Schwartz, R.J., and Nemer, M. 1996b. The atrial natriuretic factor promoter is a downstream target for Nkx-2.5 in the myocardium. *mol cell biol* 16:4648-4655
10. Durocher, D. and Nemer, M. 1998. Combinatorial interactions regulating cardiac transcription. *Developmental Genetics* 22:250-262
11. Frankel, N., Davis, G.K., Vargas, D., Wang, S., Payre, F., and Stern, D.L. 2010. Phenotypic robustness conferred by apparently redundant transcriptional enhancers. *Nature* 466:490-493
12. Georges, R., Nemer, G., Morin, M., Lefebvre, C., and Nemer, M. 2008. Distinct expression and function of alternatively spliced Tbx5 isoforms in cell growth and differentiation. *Molecular and Cellular Biology* 28:4052-4067
13. Gotea, V., Visel, A., Westlund, J.M., Nobrega, M.A., Pennacchio, L.A., and Ovcharenko, I. 2010. Homotypic clusters of transcription factor binding sites are a key component of human promoters and enhancers. *Genome Research* 20:565-577
14. Grepin, C., Dagnino, L., Robitaille, L., Haberstroh, L., Antakly, T., and Nemer, M. 1994. A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *mol cell biol* 14:3115-3129
15. Grépin, C., Dagnino, L., Robitaille, L., Haberstroh, L., Antakly, T., and Nemer, M. 1994. A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Molecular and Cellular Biology* 14:3115-3129
16. Habets, P.E., Moorman, A.F., Clout, D.E., van Roon, M.A., Lingbeek, M., van Lohuizen, M., Campione, M., and Christoffels, V.M. 2002. Cooperative action of Tbx2 and Nkx2.5 inhibits ANF expression in the atrioventricular canal:

implications for cardiac chamber formation. *Genes and Development* 16:1234-1246

17. He, A., Kong, S.W., Ma, Q., and Pu, W.T. 2011. Co-occupancy by multiple cardiac transcription factors identifies transcriptional enhancers active in heart. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 108:5632-5637
18. He, Q. and LaPointe, M.C. 1999. Interleukin-1beta regulation of the human brain natriuretic peptide promoter involves Ras-, Rac-, and p38 kinase-dependent pathways in cardiac myocytes. *Hypertension* 33:283-289
19. Holtwick, R., van Eickels, M., Skryabin, B.V., Baba, H.A., Bubikat, A., Begrow, F., Schneider, M.D., Garbers, D.L., and Kuhn, M. 2003. Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *J.Clin.Invest* 111:1399-1407
20. Horsthuis, T., Houweling, A.C., Habets, P.E., de Lange, F.J., el, A.H., Clout, D.E., Moorman, A.F., and Christoffels, V.M. 2008. Distinct regulation of developmental and heart disease-induced atrial natriuretic factor expression by two separate distal sequences. *Circulation Research* 102:849-859
21. Houweling, A.C., Somi, S., Massink, M.P., Groenen, M.A., Moorman, A.F., and Christoffels, V.M. 2005. Comparative analysis of the natriuretic peptide precursor gene cluster in vertebrates reveals loss of ANF and retention of CNP-3 in chicken. *Dev Dyn.* 233:1076-1082
22. Houweling, A.C., van Borren, M.M., Moorman, A.F., and Christoffels, V.M. 2005. Expression and regulation of the atrial natriuretic factor encoding gene *Nppa* during development and disease. *Cardiovascular Research* 67:583-593
23. Kapoun, A.M., Liang, F., O'Young, G., Damm, D.L., Quon, D., White, R.T., Munson, K., Lam, A., Schreiner, G.F., and Protter, A.A. 2004. B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor-beta in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation. *Circulation Research* 94:453-461



24. Knowlton, K.U., Rockman, H.A., Itani, M., Vovan, A., Seidman, C.E., and Chien, K.R. 1995. Divergent pathways mediate the induction of ANF transgenes in neonatal and hypertrophic ventricular myocardium. *Journal of Clinical Investigation* 96:1311-1318
25. Langub, M.C., Jr., Watson, R.E., Jr., and Herman, J.P. 1995. Distribution of natriuretic peptide precursor mRNAs in the rat brain. *J.Comp Neurol.* 356:183-199
26. LaPointe, M.C., Wu, G., Garami, M., Yang, X.P., and Gardner, D.G. 1996. Tissue-specific expression of the human brain natriuretic peptide gene in cardiac myocytes. *Hypertension* 27:Pt 2):715-22
27. Lavallee, G., Andelfinger, G., Nadeau, M., Lefebvre, C., Nemer, G., Horb, M.E., and Nemer, M. 2006. The Kruppel-like transcription factor KLF13 is a novel regulator of heart development. *EMBO J* 25:5201-5213
28. Lusk, R.W. and Eisen, M.B. 2010. Evolutionary mirages: selection on binding site composition creates the illusion of conserved grammars in *Drosophila* enhancers. *PLoS.Genet.* 6:e1000829
29. Ma, K.K., Ogawa, T., and de Bold, A.J. 2004. Selective upregulation of cardiac brain natriuretic peptide at the transcriptional and translational levels by pro-inflammatory cytokines and by conditioned medium derived from mixed lymphocyte reactions via p38 MAP kinase. *J.Mol.Cell Cardiol.* 36:505-513
30. Marttila, M., Hautala, N., Paradis, P., Toth, M., Vuolteenaho, O., Nemer, M., and Ruskoaho, H. 2001. GATA4 mediates transcriptional activation of the B-type natriuretic peptide gene expression in response to hemodynamic stress. *Endocrinology* 142:4693-4700
31. Masters, R.G., Davies, R.A., Veinot, J.P., Hendry, P.J., Smith, S.J., and de Bold, A.J. 1999. Discoordinate modulation of natriuretic peptides during acute cardiac allograft rejection in humans. *Circulation* 100:287-291

32. Meirovich, Y.F., Veinot, J.P., de Bold, M.L., Haddad, H., Davies, R.A., Masters, R.G., Hendry, P.J., and de Bold, A.J. 2008. Relationship between natriuretic peptides and inflammation: proteomic evidence obtained during acute cellular cardiac allograft rejection in humans. *J.Heart Lung Transplant.* 27:31-37
33. Morin, S., Paradis, P., Aries, A., and Nemer, M. 2001. Serum response factor-GATA ternary complex required for nuclear signaling by a G-protein-coupled receptor. *Molecular and Cellular Biology* 21:1036-1044
34. Nemer, M. 2008. Genetic insights into normal and abnormal heart development. *Journal of Cardiovascular Pathology* 17:48-54
35. Newton-Cheh, C., Larson, M.G., Vasan, R.S., Levy, D., Bloch, K.D., Surti, A., Guiducci, C., Kathiresan, S., Benjamin, E.J., Struck, J., et al. 2009. Association of common variants in NPPA and NPPB with circulating natriuretic peptides and blood pressure. *Nature in Genetics* 41:348-353
36. Palstra, R.J. 2009. Close encounters of the 3C kind: long-range chromatin interactions and transcriptional regulation. *Brief.Funct.Genomic.Proteomic.* 8:297-309
37. Parlakian, A., Tuil, D., Hamard, G., Tavernier, G., Hentzen, D., Concordet, J.P., Paulin, D., Li, Z., and Daegelen, D. 2004. Targeted inactivation of serum response factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality. *mol cell biol* 24:5281-5289
38. Perry, M.W., Boettiger, A.N., Bothma, J.P., and Levine, M. 2010. Shadow enhancers foster robustness of *Drosophila* gastrulation. *Curr.Biol* 20:1562-1567
39. Saito, Y. 2010. Roles of atrial natriuretic peptide and its therapeutic use. *J.Cardiol.* 56:262-270

40. Schroder, A., Eichner, J., Supper, J., Eichner, J., Wanke, D., Hennekes, C., and Zell, A. 2010. Predicting DNA-binding specificities of eukaryotic transcription factors. *PLoS.ONE*. 5:e13876
41. Segal, E., Raveh-Sadka, T., Schroeder, M., Unnerstall, U., and Gaul, U. 2008. Predicting expression patterns from regulatory sequence in *Drosophila* segmentation. *Nature* 451:535-540
42. Takeuchi, J.K., Mileikovskaia, M., Koshiba-Takeuchi, K., Heidt, A.B., Mori, A.D., Arruda, E.P., Gertsenstein, M., Georges, R., Davidson, L., Mo, R., et al. 2005. Tbx20 dose-dependently regulates transcription factor networks required for mouse heart and motoneuron development. *Development* 132:2463-2474
43. Thuerlauf, D.J. and Glembotski, C.C. 1997. Differential effects of protein kinase C, Ras, and Raf-1 kinase on the induction of the cardiac B-type natriuretic peptide gene through a critical promoter-proximal M-CAT element. *Journal of Biological Chemistry* 272:7464-7472
44. tomaru Ki, K., Arai, M., Yokoyama, T., Aihara, Y., Sekiguchi Ki, K., Tanaka, T., Nagai, R., and Kurabayashi, M. 2002. Transcriptional activation of the BNP gene by lipopolysaccharide is mediated through GATA elements in neonatal rat cardiac myocytes. *J.Mol.Cell Cardiol.* 34:649-659
45. Trajanovska, S., Inoue, K., Takei, Y., and Donald, J.A. 2007. Genomic analyses and cloning of novel chicken natriuretic peptide genes reveal new insights into natriuretic peptide evolution. *Peptides* 28:2155-2163

## 4.10 Supplementary Data S1

**Supplemental Data S1.** Genomic positions and DNA sequences in several mammal and bird species, according to UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>), of the four different ECRs enriched in evolutionary conserved TFBSs in Human, Mouse, and Rat. The genomic positions and DNA sequences are extracted from the Human (GRCh37/hg19: *Homo sapiens*. Feb. 2009 draft assembly), Orangutan (WUGSC 2.0.2/ponAbe2: *Pongo pygmaeus abelii*. July 2007 draft assembly), Rhesus macaque (MGSC Merged 1.0/rheMac2: *Macaca mulatta*. Jan. 2006 draft sequence), Chimpanzee (CGSC 2.1.3/panTro3: *Pan troglodytes*. Oct. 2010 draft assembly), Gorilla (gorGor3.1/gorGor3: *Gorilla gorilla gorilla*. May 2011 draft assembly), Gibbon (GGSC Nleu1.0/nomLeu1: *Nomascus leucogenys*. Jan. 2010 draft assembly), Horse (Broad/equCab2: *Equus caballus*. Sep. 2007 draft assembly), Cow (Bos\_taurus\_UMD\_3.1/bosTau6: *Bos taurus*. Nov. 2009 draft assembly), Mouse (NCBI37/mm9: *Mus musculus*. July 2007 draft assembly), Rat (Baylor 3.4/rn4: *Rattus norvegicus*. Nov. 2004 draft assembly), Opossum (Broad/monDom5: *Monodelphis domestica*. Oct. 2006 draft assembly), Chicken (WUGSC 2.1/galGal3: *Gallus gallus*. May 2006 draft assembly), Turkey (TGC Turkey\_2.01/melGal1: *Meleagris gallopavo*. Dec. 2009 draft assembly), and Zebra finch (Songbird) (WUGSC 3.2.4/taeGut1: *Taeniopygia guttata*. Jul. 2008 draft assembly).

### US1a Genomic positions + DNA sequences

```
>hg19_Human US1a_255bp range=chr1:11954145-11954399 5'pad=0 3'pad=0
strand=- repeatMasking=none
TTGCAAGATCAGTTCCCTGCTTTGAGCCTTCCAGCTGCAACTTTCTGAGGTTC
TAGAAGGAGGAATACTCACCCCTGTTTCATGGGGTCAAGTATAGGAGATAATTG
CCTGCGAGACGCACTGACCCCTCCCTTTCCCCCATTATATCTCACCCCACTC
TCCCCAGACACTCTGGGGATGCAGGGTCCCCTGGAGGGCGCTGCTACTGCA
TCTCCAGCAGGTGGCGCTGGAGGCTCTCTCCTTACCTGGGCGACA
```

### No Chimpanzee sequence

```
>gorGor3_Gorilla US1a_258bp range=chr1:12159866-12160123 5'pad=0 3'pad=0
strand=- repeatMasking=none
```

TTGCAAGATCAGTTCCCTGCTTTGAGCCTTCCAGCTGCAACTTTCTGAGGTTC  
TAGAAGGAGGAATACTCACCCCTGTTTCATGGGGTCAAGTATAGGAGATAATTG  
CCTGCGAGACGCACTGACCCCTCCCTTTCCCCCGTTATATCTCACCCAG  
TCTCCCCAGACATACTCTGGGGATGCAGGGTCCCCTGGAGGGCGCTGCTACT  
GCATCTCCAGCAGGTGGCGCTGGAGGCTCTCTCCTTACCTGGGCGACA

>ponAbe2\_Orangutan US1a\_218bp range=chr1:218396151-218396368 5'pad=0  
3'pad=0 strand=+ repeatMasking=none  
CTGCAACTTTATGAGGTTTAGAAAGAGGAATACTCACCCCTGTTTCATGGGGTCA  
AGTATAGGAGCTAATCGCTGCAAGACGCACTAATCCCCTCACGTCCCCCGTT  
ATATCTCACCCAGTCTCCCCAGACATCTCTGCGGATGCAGGGTCCCCTGGA  
GGGCGCTGCTACTACATCTCCAGCAGGTGGCGCTGGAGGCTCTCTCCTTACC  
TGGGCGACA

>nomLeu1\_Gibbon US1a\_257bp range=GL397361:5462144-5462400 5'pad=0  
3'pad=0 strand=- repeatMasking=none  
TTGCAAGATCAGTTCCCTGCTTTGAGCCTTCCAGCTGCAACTTTCTGAGGTTC  
TAGAAGGAGGAATACTCACCCCTGCTCATGGGGTCAAGTATAGGAGTGAATC  
GCCTGCGAGATGCACTGACCCCTCCCTGTCCCCCGTTATATCTCACCCAG  
TCTCCCCAGACATACTCTGGGGATGCAGGGTGCAGTGGAGGGCGCTGCTAC  
AGCATCTCCAGCAGGTGGCGCTGGAGGCTATCTCCTTACCTGGGCGACA

>rheMac2\_Rhesus macaque US1a\_252bp range=chr1:14996986-14997237  
5'pad=0 3'pad=0 strand=- repeatMasking=none  
TTGCAAGATCAGTTCCCTGCTTTAAGCCTTCCAGCTGCAACTTTCTGAGGTTC  
TAGAAGGAATACTCGCACTTGTTTCATGGGGTCAAGTATAGGAGCTAATCGCCT  
GTGAGACGCACTGACCCCTCCCTGTCCCCCATTACATCTCACCCAGTCTCC  
CCAGACCCACTCTGGGGATTGAGGGTCCCCGGAGGGCGCTGCTACCTCATC  
TCCAGCAGGTGGCGCCAGAGGCTCTCTCCTTACCTGGGCGACG

>equCab2\_Horse US1a\_248bp range=chr2:39774278-39774525 5'pad=0 3'pad=0  
strand=+ repeatMasking=none  
CCTGCTTTGAGCCTTCCAGCTGCAACTTTCTAAGGTTCTGGCAGGAAGAATAC  
CCACGCCTTTTGTAGGGTCAAGTTTAGGAGCTAACCTCCTGAGAGGCAGCCT  
GGCCTGTGCCCTGCCCTCCGTTGTCTACCCCCACCCTTTCTGTGGCCGG  
GGATGACTTTGGGGATGCAGGGTCCACTGGAATGCTCCTGCTGTGTGTCCA  
GCAGGTGGCAGTGAAGGCTCTCTCTTACCTGGGTGACA

>bosTau6\_Cow US1a\_263bp range=chr16:42663201-42663463 5'pad=0 3'pad=0  
strand=+ repeatMasking=none  
TTGCAAGGTCAGGTGTATTTTGAAGCGCCAGATGCAGCTAAGTTTCTGGCAGG  
AGGAACCCACACCTATTTATAGGATCAAGTATAGGACTAATCTCCTGAGAAGC  
CGTCTTGCCCTGCTCCCTGCTGCTCATACCTACCTCCCCAACCCAGTTT  
CCTCAGTGGCCAGGGCTGACGTGTTCTGGGGATGCAGGGTCCGCTAGAGAT  
GCTGCTACTGTGTCTCCAGCAGGTGGCGCTGAAGGCTCTCTGGTCACCTGCT  
CA

>mm9\_Mouse US1a\_236bp range=chr4:147334266-147334501 5'pad=0 3'pad=0  
strand=+ repeatMasking=none

TTGTAAGGCCAGGCTCAGGCTTTGAGCTTCCCAGCTTCGAATTCCTGATGTTA  
CTACAAGAAGGATGCTTATGCCTATTTGTAGTCAAGTGTAGGCCTCCAGAGAG  
GCCCTTCATCCCCTCCTTGTCCCTACTCAAATCTTGCCTCTGTCTCATATCCTT  
GGGATGTCCCCTATAGAATGCTGCTACTCTATCTCCAGCAGGTGGCGCTGAA  
GGCCTTTTCCTTACCTGGGTAACA

>rn4\_Rat US1a\_241bp range=chr5:165036043-165036283 5'pad=0 3'pad=0  
strand=+ repeatMasking=none

TTGTAAGGCCAGGCTCAGGTTATGAGCTTTCCAGCTTCGTATTCTCGAGGCTG  
CTACAAGACAGATGCTCATACCTATTTATAGTCAAGTATAGGCCTCTAGAGAT  
GCCCCTGAGCCCCTCCTTGTCCCTACTCAAACCTCGCCTCAGTCTCACAAGA  
CATCCTTGGGACGTCCCCCATAGAATGCTGCTACTGTACCTCCAGCAGGTGG  
CGCTGAAGGTCTTTTCCTTACCTTGGCGACA

No Opossum sequence

No Chicken sequence

No Turkey sequence

No Zebra finch sequence

### US1b Genomic positions + DNA sequences

>hg19\_Human US1b\_544bp range=chr1:11952175-11952718 5'pad=0 3'pad=0  
strand=- repeatMasking=none

GGGAGACACTAAACAGGTGTTTCCAATGTGTGTTTGTGTCCTGGGTGTTTCAGA  
AGCTGGAGATGAGCTGGGGAGGTTTGTCTTTGGTCCCAAATAGCTTCTCCTA  
GGCTTCTTTTAGGGGACCAGGAATGCCAGGTGGTCTCGAAGGCAGGGTCCA  
CAGCAAACCTGGTTTGCTCCTGTCCTGTGGATGGGATGGGTAGGATGGGAGGC  
ACCTGGGCTGTGCTTCCCCCACTGGAGGTTTGAGATCTCAGAGCTATGGGAC  
TCCAAGAAGCAGGCAAGCTCCAGGGACATGAGGACCCTTTGCAGGGTGAGG  
AATCAGATTGAGTGAGACACAGGAAGCCCATGGATGGGGAAGGGGGCCTCT  
GAGGTGGGGCAGGTCTCAGTCTGGAGCTCCTGGGAGTGACACTGGAATCCG  
TTCATCACCGACGCCCGGTGGACTCTCCTTTTCTGCATTCCACTGGCCAGCC  
CCAGAGAGGTGGGGGCCATCTTTGGACCTACAGAAATCTTCATGTCACATGC  
TCCACCAGCACCTCAGCAACTTTATCT

No Chimpanzee sequence

>gorGor3\_Gorilla US1b\_544bp range=chr1:12155205-12155748 5'pad=0 3'pad=0  
strand=- repeatMasking=none

GGGAGACACTAAACAGGTGTTTCCAATGTGTGTTTGTGTCCTGGGTGTTTCAGA  
AGCTGGAGATGAGCTGGGGAGGTTTGTCTTTGGTCCCAAATAGCTTCTCCTA  
GGCTTCTTTTAGGGGACCAGGAATGCCAGGTGGTCTCGAAGGCAGGGTCCA  
CAGCAAACCTGGTTTGCTCCTGTCCTGTGGATGGGATGGGTAGGATGGGAGGC  
ACCTGGGCTGTGCCTCCCCCACTGGAGGTTTGAGATCTCAGAGCTATGGGAC  
CCCAAGAAGCAGGCAAGCTCCAGTGACATGAGGACCCTTTGCAGGGTGAGG

AATCAGATTGAGTGAGACACAGGAAGCCCATGGATGGGGAAGGGGGCCTCT  
 GAGGTGGGGCAGGTCTCAGTCTGGAGCTCCTGGGAGTGACACTGGAATCCG  
 TTCATCACCGACGCCCACTGGACTCTCCTTTTCTGCATTCCACTGGCCAGCCC  
 CAGAGAGGTGGGGGCCATCTTTGGACCTACAGAAATCTTCGTGTCACATGCT  
 CCATCGGCACCTCAGCAACTTTATCT

>ponAbe2\_Orangutan US1b\_543bp range=chr1:218397758-218398300 5'pad=0  
 3'pad=0 strand=+ repeatMasking=none

GGGAGACATTAAACAGGTGTTTCCAATGTGTGTTTGTGTCCTCGGTGTTCAGA  
 AGCTGGAGATGAGCTGGGGAGGTTTGTGTTTGGTCCCAAATAGCTTCCCTAG  
 GCTTCTTTTAGGGGACCAGGAATGCCAGGTGGTCTCGAAGGCAGGGTCCATA  
 GCAAACCTGGTTTGCTCCTGTCCTGTGGATGGGATGGGTGGGATGGGAGGCA  
 CCTGGGCTGCGCTTCCCCTACTGGAGGTTTGAGATCTCAGAGCTGTGGGACC  
 CCAAGAAGCGGGCAAGCTCCAGTGACATGAGGACCCTTTGCAGGGTGAGGA  
 ACCAGATTGAGTGAGACACAGGAAGCCCATGGATGGGGAAGGGGGCCTCTG  
 AGGTGGGGCAGGTCTCAGTCTGGAGCTCCTGGGAGTGACACTGGAATCTGTT  
 CATCACCGACGCCCGGCGGACTCTTCTTTTCTGCATTCCACTGGCCAGCCCC  
 ACAGGGGTGGGGGCCATCTTTGGACCTGCAGAAATCTTTGTGTCACATGCTC  
 CATCAGCACCTCAGCAACTTTATCT

>nomLeu1\_Gibbon US1b\_544bp range=GL397361:5460162-5460705 5'pad=0  
 3'pad=0 strand=- repeatMasking=none

GGGAGACACTAAACAGGTGTTTCCAATGTGTGTTTGTGTCCTGGGTGTTCAGA  
 AGCTGGAGATGAGCTGGGGAGGTTTGTCTTTGGTCCCAAGTAGCTTCTCCTA  
 GGCCTCTTTTAGGGGACCAGGAATGCCAGGTGGTCTCGAAGGCAGGGTCCA  
 CAGCAAACCTGGTTTGCTCCTGTCCTGCGGCTGGGATGGGTAGGATGGGAGG  
 CATCTGGGCTGTGCTTCCCCCACTGGAGGTTTGAGATCTCAGAGCTGTGGGA  
 CCCCAGAAGTGGGCAAGCTCCAGTGACATGAGGACCCTATGCAGGGTGAG  
 GAACCAGATTGAGTGAGACACAGGAAGCCCATGGATGGGGAAGGGGGCCTC  
 TGAGGTGGGGTAGGTCTCAGTCTGGAGCTCCTGGGAGTGACGCTGGAATCC  
 GTTCATCACCGACGCCCGGCGGACTCTTCTTTTCTGCATTCCACTGGCCAGC  
 CCCAGAGAGGTAGGGGCGGTCTTTGGACCTGCAGAAATCTTCGTGTCACATG  
 CCCATCAGCACCTCAGCAACCTTATCT

>rheMac2\_Rhesus macaque US1b\_544bp range=chr1:14995011-14995554  
 5'pad=0 3'pad=0 strand=- repeatMasking=none

AGGTGACACTAAACAGGTGTTTCCAATGTGTGTTTGCATCCTGGGTGTTCAGA  
 AGCTGGAGATGAGCTGGGGAGGTTTGTCTTTAGTCCACATAGCTTCTCCTA  
 GGCCTCTTTTAGGGGACCAGGAATGCCAGGTGGTCTTGAAGGCAGGGTCCA  
 CAGCAAACCTGGCTTGCTCCTGTCCTGTGGATGGGACGGGTAGGATGGGAGG  
 CATCTGGGGTACGCTTCCCCCACTGGAGGTTTGAGATCTCAGAGCTGTGGGA  
 CCCCAGAAGCAGACAAGCTCCAGTGACATGAGGACCCTTTGGAGGGTGAG  
 GAACCAGACTGAGTGACCCACAGGAAACCCATGGATGGGGAAGGGGGCCTC  
 TGAGGTGGGGCAGGTCTCAGTCTGGAGCTCCTGGGAGTGACACTGGAATCC  
 ATTTATCACCGACGTCCGGCGGACTCTTCTTTTCTGCATTCCACTGGCCAGCC  
 CCGGAGAGGTGGGGGCCATCTTTGGAGCTGCAGAAATCTTCGTGTCACATGT  
 CCCATCAGCACCCAGCAACCTTATCT

>equCab2\_Horse US1b\_551bp range=chr2:39775598-39776148 5'pad=0 3'pad=0  
strand=+ repeatMasking=none

GGGAGGCACTAAGCAGGTGCTTCCAAGGTGTGTGTGTGTCCTGGGCGTTCA  
GAGGCTGGAGCCTCCTGCATTGGTGGGTTGAACTGGTGGCGGAGGGGTGTC  
TTTGGTCCTAAGTGGCTTCCCTTGGGTCTCCTTTAGGGCACGAGGAATGCTG  
GATAGTCTCAAAGGGAGGGTCTCGGCAGCCCAGTTCGCTCCTGTCCTGGAG  
GCATCTCGGCTGCCCTTCCCCCGCCGGGGATCTCCGATCTCAGGGCTGTGG  
ACTCCCGAGGGGCAAGCAAGCCCCAGTGATGCGAGGACCTTCTGGAGGGTG  
AGGAGCCCCGACAGGTGAGACACAGGAAGCCCTCGGCTGGGGAGGGGGCCT  
TGGAGGTAGGGCAGGTCTCAGCCTGGGGCTCCTGAGATTGACACTGGAATCT  
GTCCATCAGCGACGCCCTGGCCATCACCTGACCTTTCTTTTTGGCATTCCACC  
AGCCAGGCCTGCGGAGGGTGGGGGCTGTCTCGGGAGCTGCAAAAATCTTCA  
CGTCACATGCCCCATCAGCACCTCAGCAACCTTATCT

>bosTau6\_Cow US1b\_514bp range=chr16:42665046-42665559 5'pad=0 3'pad=0  
strand=+ repeatMasking=none

GGAAACTGCTAGACAGGTGTTTCAGAGGAATATCTATGTCCTGGGTGTTCTGA  
GGCTGGAGTCTCCTGCATCGATGGGTTGAGTGGGATTCCAAGTAGCTTCTCT  
GGGTCTCTTTTCGGACATCAGTAATGCCATCTGGTCTCGAAGGCAGGATTC  
ACAGCAAGCTTTCTGCTCCTGCTATAGAGGACAGATGAGTCCAGTGGGAGAC  
ATCTGGGACCTCAGAGCTGTGGGACCCCAAGAGGCAGGCGAGCCCCAGGAC  
CCTTTGGAGGGCAAGGAGCCAGGGCTGGTCAGACACAGGAAATGCACAAGT  
GGGGAGGTGGCCTCGAAAGTGAGGCAGGTCTCAGCCCGGAGCCCCTGGGAT  
TGACACTGGAATCTGCCCATCATGGACGCCCTGTCCATCACCTGACCTTCTC  
GTCTGCATTCTCTGGCCAGACAGGGAGGGTGGGGGCTGGCTTTGGAGCTG  
CAAAAATCTGCGTGTACATGGCTCATCAGCACCTCGGCCACCTTATCT

>mm9\_Mouse US1b\_499bp range=chr4:147334519-147335017 5'pad=0 3'pad=0  
strand=+ repeatMasking=none

GGATGACACTGAACAGTTAGTTGTCCCACAGCTTCCTGGGTAGGCGGAAGTG  
AGATCCTGCCCCAGCCCACTGCCAAATGGGCAAGGCTGTGTTTGGTTCCAG  
TGAGCTTCTTTTGGGGGCTACATTAAGGGGTCCATTTGGCTCCCAGAGCCTG  
CAGCAAGCCAGCTTATTGTGGGGGGGGGGATCTGATTGGAGGCCTCTGAGC  
TGTCCTTCCTCTGTGGGAAGTCCCATGTCTCAGGACCCTAGGGGCAGTGGTG  
AGACTGTGGTTTAGAAGGTGAGGAGGCTCAGGGATGGGGTGAGGGGCCACG  
GGAAGCTTGTGAATGGGGTATGATCTCAGAGGCAGACAGTCTCAGCTTGGAC  
ACTGGAATCTATCCATCATCGACACTGCTGGCCATTCTTTCTGCATTCCACA  
ACAGCCCCACAGGGTGAGGACCATCTACAGAGCTACAGAGATGGGTCTGTCA  
CGAGCCCCATCAGCACCTCAGACACTTGATCT

>rn4\_Rat US1b\_440bp range=chr5:165036304-165036743 5'pad=0 3'pad=0  
strand=+ repeatMasking=none

GGATGACACTGAACAGACATCCCACAGCTTCCTGGGTATGTGGAAGTGAGAT  
CCTGCCCCAGTCTTTTTGGGGCTACATTAAGGGGTCCATTTGGCTGTCGTCTG  
CAGCACAGCCAGCTTACTGTCTAGGAAGGGAGGGACCTGATTGGAGGCCTCT  
GAGCTGTTCTTCCTCTTTTCCGTGTATCACTAGGGGGAGTGGGGAGACTGTA  
GTTTAGAGGGTTAGGAAGCTCGTGGATGGGGTGAGGGGCCACAGGAAGCTT  
ATGAATGGGGTATGATCTCAGAGGCAGGCAGTCTCAGCTTGGACATTGGAAT  
CTACCCATCATTGACACCTGCTGGCCATTCTTTCTGCATTCCACAGTGGCCC



TGAAGAGTGGGGACCGTCTGCAGAGCTACAGAGATGTCTGTCACAATCCCCA  
TAAGCACCTCAGAACTTAATCT

No Opossum sequence

No Chicken sequence

No Turkey sequence

No Zebra finch sequence

## US2 Genomic positions + DNA sequences

>hg19\_Human US2\_877bp range=chr1:11947038-11947914 5'pad=0 3'pad=0  
strand=- repeatMasking=none

CTCCCGGGGCGCAGGTGTCAGCTCACCCACGATTCCTACAGGTGGAGCTGC  
GGCTATGAAGCCTTGATTTCCAGGGGTTGGGGACCTGGATTTGAGTCACTTT  
CGTTTGTGCCACGCCTGAGCATGGCAGACCCCCAGGGAGGAGTTGGGAGTG  
GGCTCTCGCAGGACCCCTGCCATGGTGGGTGCTGTGAGCTGCCCTCCCAGA  
GGTGAGTTCTCTGGGTCCTGCCACACAAAACACATGGCAGGGGGCGTGGATCC  
CTACACCCAAACCCATACAAGGCCTTGGACCTGTGCTCACCAACTCAGATCAC  
GGGGATGCAGGGGGTTACCTTCTCCAAGGAAGGGCCAGGGACACAAGAGA  
AAACAGGGAGCTATTTTGAGAAGGTGTCAAGGCTGGGACACTAAAATTAGAG  
GCTTGGTTCTCTAAAAGACATTGGCGCCAACCGAGGCCTTGAAGAGGGGGCTC  
TTCAGCACGGAATGTGACCCCAGGAAGCACGCTCACAATTCTGGACAATGAG  
GTCAGCCTGCAGGGCGCATGGGACCGCCCAATGGCCGGTGGGCATGGGCA  
CCTCTCCCCCGCCAGCCCCACCTGCAGAATGCTGGAACTGGCTCCAACCG  
CTTCCCGTCTGCACTGAGCCAGCGCAAGGGCGAGCGGACAGAGCCTCATGT  
TCCCGGTGCTGCTGCCCTTCCAGGCTGCCTTCTTTTTTACTGTCTTTTGG  
CTTCTTATGCTTTTGGCTCCATTCTGGATGTGCGTCATGGGGTGGGATGCAGA  
AGCAGCAGCCAGCTTGGAGGCTGGTGTTCGCGAGGCTGAGGGCGGGATG  
GGGGGAAATATGAACCAGGAAAGGGCCTGGTATCCCCAGCCCAGATGGGCC  
T

>panTro3\_Chimpanzee US2\_877bp range=chr1:12037071-12037947 5'pad=0  
3'pad=0 strand=- repeatMasking=none

CTCCCGGGGCGCAGGTGTCAGCTCACCCACGATTCCTACAGGTGGAGCTGC  
GGCTATGAAGCCTTGATTTCCAGGGGTTGGGGACCTGGATTTGAGTCACTTT  
CGTTTGTGCCATGCCTGAGCATGGCAGATCCCCAGGGAGGAGACGGAAGTG  
GGCTCTCGCAGGACCCCTGCCATGGTGGGTGCTGTGAGCTGCCCTCCCAGA  
GGTGAGTTCTCTGGGTCCTGCCACACAAAACACATGGCAGGGGGCGTGGATCC  
CTACACCCAAACCCATACAAGGCCTTGGGCCTGTGCTCACCAACTCAGATCA  
CGGGGATGCAGGGGGTTACCTTCTCCAAGGAAGGGCCAGGGACACAAGAG  
AAAACAGGGAGCTATTTTGAGAAGGTGTCAAGGCTGGGACACTAAAATTAGA  
GGCTTGGTTCTCTAAAAGACATTGGCGCCAACCGAGGCCTTGAAGAGGGGGCT  
CTTCAGCACGGAATGTGACCCCAGGAAGCACGCTCACAATTCTGGACAGTGA  
GGTCAGCCTGCAGGGCGCATGGGACCGCCCAATGGCCGGTGGGCATGGGC  
ACCTCTCCCCCGCCAGCCCCACCTGCAGAATGCTGGAGCTGGCTCCAACC

GCTTCCCGTCTACACTGAGCCAGCGCAAGGGTGAGCGGACAGAGCCTCATG  
 TTCCCGGTGCTGCTGCCCTTCCAGGCTGCCTTCCTTTTTTGAAGTGTCTTTTG  
 GCTTCTTATGCTTTTGGCTCCATTCTGGATGTGCGTCACGGGGTGGGATGCA  
 GAAGAAGCAGCCAGCTTGGAGGCTGGTGTTCCTGGAGGCTGAGGGCGGGAT  
 GGGGGGAAATATGAACCAGGAAAGGGCCTGGTATCCCCAGCCCAGATGGGC  
 CT

>gorGor3\_Gorilla US2\_870bp range=chr1:12149788-12150657 5'pad=0 3'pad=0  
 strand=- repeatMasking=none

CTCCCGGGGCGCAGGTGTCAGCTCACCCACGATTCTACAGGTGGAGCTGC  
 GTCTATGAAGCCTTGATTTCCAGGGGCTGGGGACCTGGATTTGAGTCACTTTC  
 GTTTGTGCCACGCCTGAGCATGGCAGACCCCCAGGGAGGAGACGGGAGTGG  
 GCTCTCGCAGGACCCCTGCCACGGTGGGTGCTGTGAGCTGCCCTCCCAGAG  
 GTGAGTTCTCTGGGTCTGCCACACAAAACACATGGCAGAGGCGTGGATCCC  
 TACACCCAAACCCATACAAGGCCTTGGGCCTGTCTACCAACTCAGATCACG  
 GGGATGCAGGGGGTTACCTTCTCCAAGGAAGGGCCAGGGACACAAGAGAA  
 AACAGGGAGCTATTTTGAGAAGGTGTCAAGGCTGGGACACTAAAATTAGAGG  
 CTTGGTTCCTAAAAAGACATTGGCGCCAACCGAGGCCTTGAAGAGGGGCTCT  
 TCAGCACGGAATGTGACCCCAGGAAGCATGTTTACAATTCTGGACAATGAGG  
 TCAGCCTGCAGGGCGCATGGGACCGCCCAATGGCCGGTGGGCATGGGCAC  
 CTCTCTCCCCGCCAGCCCCATCTGCAGAATGCTGGAGCTGGCCGCTTCCCGT  
 CTGCACTGAGCCAGCGCAAGGGCGAGTGGACAGAGCCTCATGTTCCCGGTG  
 CTGCTGCCCTTCCAGGCTGCCTTCCTTTTTTGAAGTGTCTTTTGGCTTCTTATG  
 CTTTCGGCTCCATTCTGGATGTGCGTCACGGGGTGGGATGCAGAAGAAGCAG  
 CCAGCTTGGAGGCTGGTGTTCCTGGAGGCTGAGGGTGGGATGGGGGGAAAT  
 ATGAACCAGGGAAGGGCCTGGTATCCCCAGCCCAGATGGGCCT

>ponAbe2\_Orangutan US2\_877bp range=chr1:218402540-218403416 5'pad=0  
 3'pad=0 strand=+ repeatMasking=none

CTCCTGGGGCGCAGGTGTCAGCTCACCCACGATTCTACAGGTAGAGCTGC  
 GGCTACGAAGCCTTGATTTCCAGGGGTTGGGGACCTGGATTTGGGTCACTTT  
 CATTTGTGCTACGCCTGAGCATGGCAGACCCCCAGGGAGGAGATGGGAGTG  
 GGCTCTCGCAGGACCCCTGCCATGGTGGGTGCTGGGAGTTGCCCTCCCAGA  
 GGTGAGTTCTCTGAGTCCTGCCACACAAAACACTTGGCAGGGGGCGTGGATCC  
 CTCCACCCAAACCCATACAAGGCCTTGGGCCTGTGCTACCAACTCAGATCA  
 CGGGGATGCAGGGGGTTACCTTCTCCAAGGAAGGGCCAGGGACACAAGAG  
 AAAACAGGGAGCTATTTTGAGAAGGTGTCAAGGCTGGGACACTAAAATTAGA  
 GGCTTGGTTCCTAAAAAGACATTGGCGCCAACCGAGGCCTTGAAGAGGGGCT  
 CTTCAGCACGGAATGTGACCCCAGGAAGCACGCTCACAATTCTGGACAATGA  
 GGTCAACCTGCAGGGCGCATGGGACCGCCCAATGGCTGATGGATATGGGCA  
 CCTCTCCCCCTGCCAGCCCCATCTGCAGAATGCTGGAGCTGGCTCCAACCGC  
 TTCCCATCTGCACTGAGCCAGCGCAAGGGCAAGCGGACAGAGCCTCACGTTT  
 CCGGTGCTGCTGCCCTTCCAGGCTGCCTTCCTTTTTTGAAGTGTCTTTTGGCT  
 TCTTATGCTTTCGGCTCCATTCTGGTTGTGCGTCACGGGGTGGGATGCAGAA  
 GGAGTAGCCAGCTTGGAGGCTGGTGTTCCTGGAGGCTGAGGGCGGGATGGG  
 AGGAAATATGAACCAGGGAGGGGCCTGGTATCCCCAGCCCAGATAGGCCT

>nomLeu1\_Gibbon US2\_877bp range=GL397361:5455115-5455991 5'pad=0  
 3'pad=0 strand=- repeatMasking=none

CTCCTGGGGCGCAGGTGTCAGCTCACCCAAGATTCCTACAGGTGGAGCTGC  
 GGCTATGAAGCCTTGATTTCCAGGGGTTGGGGACCTGGATTTGAGTCACTTT  
 CATCTGTGCCATGCCTGAGCACGGCAGACCCCCAGGGAGGAGACGGGAGTG  
 GGCTCTCGCAGGACCCCTGCCAAGGTGAGTGCTGTGAGCTGCCCTCCCAGA  
 GGTGAGTTCTCTGGGTCTGCCACACAAAACACATGGCAGGAGCTCGGATCC  
 CTCCACCCAAACCCATACAAGGCCTTGGGCCTGTGCTCACCAACTCAGATCA  
 CGGGGATGCAGGGGGTTACCTTCTCCAAGGAAGGGGCCAGGGACACAAGAG  
 AAAACAGGGAGCTATTTTCGAGAAGGTGTCAAGGCTGGGACACTAAAATTAGA  
 GGCCTCGTTTCCTAAAAAGACATTGGCGCCAACCAAGGCCTTGAAGAGGGGCT  
 CTTCAGCACGGAATGTGACCCCAAGGAAGCACGTTTACAATTCTGGACAATGA  
 GGTCAGCCTGCAGGGCGCATGGGACCGCCCAATGGCCGGTGGTCATGGGCA  
 CCTCTCCCCCACCAGCCCCACCTGCAGAAATGCTGGAGCTGGCTCCAACCAC  
 TTCCCGTCTGCACTGAGCCAGCGCAAGGGCAAGCGGACAGAGCCTCACGTT  
 CCCGGTGCTGCTGCCCTTCCAGGCTGCCTTCTTTTTTGAAGTGTCTTTTGGC  
 TTCTTATGCTTTTCAAGCTCCATTCTGGATGTGCGTCAGGGGGTGGGATGCAGA  
 AGAAGCAGCCGGCTTGGAGGCTGGTGTTCCTGGAGGCTGAGGGCGGGATGG  
 GGGGAAATATGAACCAGGGAGGGGGCCTGGTATCCCCAGCGCAGGTGGGCCT

### No Rhesus macaque sequence

>equCab2\_Horse US2\_862bp range=chr2:39778200-39779061 5'pad=0 3'pad=0  
 strand=+ repeatMasking=none

CTGCCCTGGGGCACGGTGTGAGCCGACCCAGGATTCCTATAGTAGAGGCTG  
 GGCTTAGGCGGGCCGGATGTCCAGTGGGGTGGGGACCTGGATGAGAGTCAC  
 AGGCGTATGTGCCGCCCTGAGCTGGCAGACGACATGGGGGAGGCAGGATGA  
 GCTCCGGCGGCTGCTGTTGCTATGGGACCCCGGCCTGGTGGGCCATGCGCT  
 GCCCTCTCCCGAGCTGAGTCTCTGGGTCTGGTCACACGGAACACGCGGCA  
 GGGACACGGGTCCCTCCACCGAAACCCATACAAGGATGTGGGCCTGTGCTC  
 ACCAGTTCGGATCATGGGGACGCAGGGGGTTACCTTCTCCAAGGAAGGGG  
 CAGGGACAAGAGGGGAAAACAGGGAGCTATTTTGAAGAAGGTGTGAAGGCCG  
 GGACACTAAAATTAGACCTTTCGTTCTTAAAAAGACATTGGCGCCAACCAAGG  
 CCTGGAGAGGGGCTCTTCAGCGTGGAATGTGGCCCCAGGACGGGCTCCCGC  
 GGGCCTGGGCAGTGAGGTGAGCCTGCAGGACCAATGGGACTGCCAGTGGC  
 TGGTGGTCATGGGCCCCCTCTCCCCACCGGCCCGCCCATGAAATTCTGGAG  
 CTGGTTCCAGCCCTTCTGCCTGCGCCAGGCAAGCGGGAAGGCGAGGGCCG  
 GAGCTGCCCATTCCCGGTGCCGCCTGACCTTCCCGCTGCATTTGGCCTTTTT  
 TGAAGTGTCCCTTTGTCTCCTGTGCTTTCTGCCTCATTCCGGGGTGTGCGCCCA  
 AAAGGAGGGGGATGCTCAGAAGCAGTGGCCATCTTGGATCCTGGAGCTCCC  
 GGGGCCGGGCTGCGAGTGTGAGCCAGTGAGGGGCCAGCTGT

>bosTau6\_Cow US2\_854bp range=chr16:42668540-42669393 5'pad=0 3'pad=0  
 strand=+ repeatMasking=none

CTCCGCTGGGTCAAGGTGTCTGCTGACCCACTGTTACCACAGGCAGAGGCTG  
 AGGCTCAGCAGGCTTGATTTCCAGTGGGCTGGGGACCTGAACTTGGGCCCC  
 ATAGGCCTGTGACATGCCTGAGCATGGCCAGTGGACAGGGAGAGGGCAGGA  
 GTGAGTTCTGTGGGACCCCTGGCCTGGTGGGCGCTGAGCTGCCCTCCCCAG  
 TAGAGCCCTCTGGGTCTGGGTCAACAGGAACAGACCACAGAGACACAAGTCC  
 CTCTACCGAGACCCATACAAGGCTGTGGGCCCGTGCTCACCAGGCCGGATC  
 ACGGGGATGCAGGGGGTTACCTTCTCCAAGGAAGGGGCAGGGCCGGGAG

GGAAAACAGGGAGCTATTTTCAGGAAGGTGTCTGAAGGCCGGGACACTAAAATT  
 AGACCCTTGTTTCCTAAAAAGATATTGGCGCCATCCAAGGCCTTGAGAGGG  
 GCTCTCCAGCTCGGAATGTGACCCCAGGAGGGGCTCCGCGGGCCTGGGCAG  
 TGAGGTCAGTCCGCGGGACCAACGGCACCGCCCGACGGCTGGTGGTCACG  
 GGCATCTCTCCCCACCCACCCCGCCTGCAAAATTCTGGAGCTGGTTCCAAC  
 TGCTTCCTGTCTGCACCCAGCGCACTCTCGGGAAGGCGAGGGGGCAAACC  
 GCCAGTCCTGGCGCCATCTGGCTGCATTTTTCTTGTGTTGACTGTCCCTTTG  
 CCTCCAGTGCGTTCTTTCTGCTCCATCCTGGGGGTGTGTGTTGAGGGGAGCG  
 TACTGGGGGGGTGCTCAGAAGTGACCATCTTGAAGCTGGGGCTCCAGGCC  
 TGGACTGGGAGTATGAGCCAACGCAGGGCCTGG

>mm9\_Mouse US2\_853bp range=chr4:147337485-147338337 5'pad=0 3'pad=0  
 strand=+ repeatMasking=none

CTCCTAGTTCAAGTAGTCCACTCACACCCAACTCCTACAGATTAATATGAGTT  
 TGTTTAGGCAGCCCTGATGTCTAGGGTCTGGGGACCTGAATTTGTGTCTTGC  
 CTGACCATGGAATTTGGCAGGGAGGAAGAGGGGAGGAAACACTCACTAAGG  
 CCAGGCCATGATGGCTGGAGGAGGTCTTCTCATGGTGCCAGTTGCTGCCCTT  
 GGCCAAAAACATGTCCTCTTCATCCAGCTTCATAAACACGGCAGGGACAGAA  
 CTTGCCACACCGAAACCCATACATGGTCTGGAGACTGCACACCAACTGGGAT  
 CACAGGGACGCGCAGGGGGTTACCTCCTCCAAGGAAGAGGCAGGGATAGG  
 AGTGAAACCAGGGAGCTATTTGAGAAGGTGTCAAAGGCCGGAACACTAAAA  
 TTAGAGCCTTGTTTCCTAAAAAGACATTAGCACCAACCGAGGTCTAAGAGAGG  
 GGCTCTTCAGCGCGGAATGTGACCCCAGGAAGCGCTCCGGCGATCCTGGGC  
 AATGAGGTCAGCAGGACCAATGGGACCCTCCACCTCCCTTATGGTCACGTGG  
 TGGTCATGGGGACCTCTCCCCGAGCCAGCTCTGGGGCTGTTTCCAACCACTT  
 CCCGTGTACACCAAGCCAGGAAAGGCAAGCAGGCAGAGCTGCTGTCCGTGT  
 AGGGCTGACCTTCTGGGCTGTGCCTTTTCTTTTTTGATTGTCTCTGTGCTTTC  
 TGTTCCATTCTCAGTTTAAGAGTGGGAGAGGAGGATGCTTGGAAGAGGCAGC  
 CATCTTGGAACCTGGTGGTTTGGCCTGGGAGATAAACCAGGAAGGGCCTAGG  
 ATCCCTGGCCTGGCTGGCCT

>rn4\_Rat US2\_850bp range=chr5:165039720-165040569 5'pad=0 3'pad=0  
 strand=+ repeatMasking=none

CCTTTCCCAAGTTCAAGGGGTCCATTACCCCCAACTCCTATAGTCTGATAT  
 GGGGTTGTTTAGTCTGATGTCTAGGATCTGGGGACCTGAATTTGTGTCTTGTCT  
 TGATTATGGAAATTGGCAGGGAGGAAGCGGGGGGGGGGCACTCACTGAGGA  
 CAAACCAAGATGGCTGGAGCAGGTCTTCCGATGGTGCCAGTTGCTGCCCTTG  
 GCCAAAGACAGGTCCTCTTCATCCAGCTTCATAAACACGGCAGGGACAGAAC  
 CTGCTACACCGAAACCCATACAAGGCCTGGAGACTGCACGCCAACTCGGATC  
 ACGGGGACGCAGGGGGTTGCGCTCCTCCAAGGAGGAGTCAGGGATAGGAGT  
 GAAACCAGGGAGCTATTTGAGAAGGTGTCAAAGGCCGGAACACTAAAATTA  
 GAGCCTTGTTTCCTAAAAAGACATTGGCGCCAACCAAGGTCTGAGAGAGGGG  
 CTCTTCAGCGCGGAATGTGACCCCAGGAAGTGCTCCGACGATCCTAGGCAAT  
 GAAGTCAGCCACAGGACCAATGGGACCCTCCACCTCCCTTATGGTCACGTG  
 GTAGTCACGGGGACCTCTTCCCTGGCCAACCTCCGGGGCTGTTTCCAACCATC  
 TCCCTTGTGCACCAAGCCAGGAAAGGCGTGCGGACAGAGCTGCTGTCCGTG  
 TAGGACTGACCTGGGCTGTGCCTTTCTTTTTTGAAGTGTCTCTGTGCTTCT  
 GTTCCTTTCTCGGTTTAAAGTAGGAGAGGCGGATGCTTGGAAGAGGCAGCC

ATCTTGGAATCTGGTGT TTTTGGCCTGGGAGATAAACCGGAAAGGGCCTAGGA  
TCCCTGGCTGGCTGGCCT

>monDom5\_Opossum US2\_741bp range=chr4:365411945-365412685 5'pad=0  
3'pad=0 strand=+ repeatMasking=none  
TTCTATGAGATTTACTGCTAGGTCTGCTCTCTTGGACCTCCCGTACGGAACCC  
AAGCACAGGAGGAATGTGGGTCTTGTCTACTTCCACAACCCTCTGAAATCT  
CACAGCTCTTCTCAGCAACTTTTGAGTCCTGGGATTACCTCCAGAGGAAAGG  
ACAGTGACAAGAGGGGAAATAATGGACTATTTTGTAGAAGGTGTCGAGGGCC  
AGGGCGCTAAAATTAGACCCTTCGTTCTTAAAAAGAACTGGGAGTCAACCAAG  
GCTTGGGAGAGACTCTTCAGCAAGGAATGTGAGCCCAGGAAGTGCAGGCCT  
GAGTGATGAGGTCACCTGGGGAGGCCAATTGGATGGCTTGATTGTAAGAGGT  
CATAGAACGCTTTCTTTCTCTCCCATCCAGTCTGTTCTCCAAAAAAGTCTGGA  
ATTTGTTTCCATTTCTTGATAGCTGAATCTAGCCCCTGGGTAAAGGGGGTGA  
GGGTGAGAGCACTGGGAGAAAAATGCTCACCATTGCTCCAGTGATAACTGG  
CCTCTCTGGTCACTTCTTTCTTTTCAGGACTCTTTTCTATCTCTACTCTTTCTG  
CCCCCTTCTCACTGGGCTCTGGCTTGCTAGCTATGGGTGGGAGGGAGGCAG  
GAAAACTCAGGGAGAGCTGGCTGAGCCCTGGAAGTGGAGGACTGACGTGC  
TAACGGGGCCATATCCCTAGAGCTGTTGAGTCCCCAGCAATGGCAGCCAGAA  
GGGCTT

>galGal3\_Chicken US2\_441bp range=chr21:5742473-5742913 5'pad=0 3'pad=0  
strand=+ repeatMasking=none  
TCCTCCTCCAGCTCAGTACAGGGCTGATGGTGAGAGCAGCACCTCCAGCACC  
CTGCTCAGTAATCCTTACTGCCCAAATTTAGGCTGAATGAGGCCAGACCGAG  
GAGTGGGGACTTTGTTTTTAAGCCCTGAAGAACACGCACAAGACAGGAGAGA  
GTCAGAGTCTATTTCAAGGAAGGTGTCTGTGGCCGTCGGGCTAAAATTATACCA  
TCTGTTCTTAAAAAGACCGTGCAGAATGACAAGGATTTGGCAAGAGGCTCTTC  
AGTTGGGAATGTGACATAGGAAGTGCCTACATGGCTGTTGGCAGTGATGTCA  
CCCGCTGGTGCTGCACCGAGGGGGCTCGGGAAGCTCCGGTGGAGAGCACT  
GGAAGTTGTTCAAGCCACTCTGTATCTGCAGAGGGCTGAGTGTGGGGCAGAA  
GTGTCGACAGGCTCTGCTGCTTCCC

>melGal1\_Turkey US2\_442bp range=chr23:5773557-5773998 5'pad=0 3'pad=0  
strand=+ repeatMasking=none  
TCCTCCTCCAGCTCAACACAGGGCTGATGGTGAGAGCAGCACCTCCAGCACC  
CCGCTCAGTAATTCTTACTGCCCAAATTTAGGCTGAATGAGGCCAGGCCAAG  
GACTGGGGACTTTGTTTTTAACCCTGCAGAACACGCACAAGACAGGAGAGA  
GTCAGAATCTATTTCAAGGAAGGTGTCTGTGGCCGTCAGGCTAAAATTAGACCA  
TCTGTTCTTAAAAAGACCATGCAGCATGACAAGGATTTGGCAAGAGGCTCTTC  
AGTTGGGAATGTGACATAGGAAGTGCCTACATGGCTGTTGGCAGTGATGTCA  
CCTGCTGGTGCTGCACCAAGGGGGCCTCGGGAAGCTCCGGTGGAGAGCACT  
GGATCTTGTTCAAGCCACTCTGTATCTGCAAGGGGCTGAGTGTGGGGCAGAA  
GTGTCGACAGGCTCCACTGCTTCCC

>taeGut1\_Zebra finch US2\_431bp range=chr21\_random:93276-93706 5'pad=0  
3'pad=0 strand=+ repeatMasking=none  
ACATTCCTGTTCTCAGTATGGGTCTGACAGTGACAACATTTTTTGGCACAGGC  
TCCTGCTCCTTCCCACAGCTCACAGGCCTCAGCTCTGGGCCCTGCGGATGAG

GGATTTTGT TTTTAACTCTCAAGTACATGCACAAGGCAGGAGAGAGTAAGAA  
 CTTATTTTCAGGAAGGTGTTTGTGGCAGGAGGGTTAAAATTAGAGCGTTTGTTC  
 CTA AAAAGACTGCGTAGAACGACAAGGACTTGCGAGAGGCTCTCCAGTGGG  
 GAATGTGACACAGGAAGCTCCTACACGGGGTTTGGCAGTGATGTCACCTGGC  
 TGCCCCATGGCAGGGCCTGGGAAGCTCAGGGATGGAGCACTGGAAC TTGTT  
 CAAGCCACTCTGTATCTGCAGGCAGTGAGTGCTGAGCAGATTTGTCGACAGG  
 AGCCACCACCAGC

### US3 Genomic positions + DNA sequences

>hg19\_Human US3\_914bp range=chr1:11943237-11944150 5'pad=0 3'pad=0  
 strand=- repeatMasking=none

CCTCACCCCTCTAGCCTGAACCCCCAGGTTTATATTATATGGCTTGGGGCTTC  
 TTA CTTTGT TATTTTCTACCACTGATTTCTGAGGTTTGGTGGGAACTTG GTG  
 ACATCTGGGCTTTGTAATTAATAAAATACAAAGCAAAAAACCCGACAAAACATG  
 TTTGGTCTTTCTCTGTTTTGACTACACATTCTCGAGGGCAGGGACATTTGGG  
 GGTGCGCTTCGTCCAACAGTGGTGAGTTCATGGTAGGTGTGAACAGGTGTTT  
 GCTAAACTAAGCCCAGGACGGTGAGAAGGGCGAGCGGGTCCCTCACCAGCA  
 AGAGCCCTGGAGGATCTCTTAGGGGTGCCTGTCCCTGGCTGCCTGCCACCT  
 TTTCCAAGAGGCCTTTCTAACTCTCCTACCAGAGCCGGCAGACTGGGTCCAT  
 CCTGGAGCCCGCTTGGTGGGCTGTGGTGAGTGGAGGTTTTCCACACCACGG  
 GAAGTAGCCCAGGCTTGATGAACGATGACTTCCCGGGCGAGGGATGGAGAA  
 CATTGTACCCACTCACGTGCGGGCACAGGTGATCCCGGCTGGAGCAAAGACT  
 CTCATAGTTTGCTTCCTGCTTGGCCGTGACAATGACCCAGGCTCTCAGCCCC  
 CATGCACTTGCACTCCCCTCAGGGCCACATGGGGTGGGCTGGAGAATCC  
 CAGGAATGTGTTGGAGCTGCTGACAGCACTTCATGCTCTGCGTGTGATCGGC  
 CCATGTGACTTCCTCAGGGAAGTGTGTGCCTGGTGGGCTCCAGCACCCCTAT  
 CCTGAATCTCCAGGTCTTCTGATCCCCAGCGCTGGTGCTTAAGAGCGGGAT  
 GGGGTTGGGGGGATGCAGAGATGAAATGTAATGGGCAAATCTGCTTGCCCAT  
 GGCCACTCCACTTTGTTCTTCATCCAGG

>panTro3\_Chimpanzee US3\_914bp range=chr1:12033277-12034190 5'pad=0  
 3'pad=0 strand=- repeatMasking=none

CCTCACCCCTCTAGCCTGAACCCCCAGGTTTGTATTACATGGCTTGGGGCTT  
 CTTACTTTGT TATTTTCTACCACTGATTTCTGAGGTTTGGTGGGAACTTGGT  
 GACATCTGGGCTTTGTAATTAATAAAATACAAAGCAAAAAACCCGACAAAACAT  
 GTTTGGTCTTTCTCTGTTTTGACTACACATTCTCGAGGGCAGGGACATTTGG  
 GGTGCGCTTCGTCCAACAGTGGTGAGTTTATGGTAGGTGTGAACAGGTGTT  
 TGCTAAACTAAGCCCAGGACGGTGAGAAGGGCGAGCGGGTCCCTCACCAGC  
 AAGAGCCCTGGAGGATCTCTTAGGGGTGCCTGTCCCTGGCTGCCTGCCAC  
 CTTTTCCAAGAGGCCTTTCTAACTCTCCTACCAGGGCCGGCAGACTGGGTCC  
 ATCTGGAGCCCGCTTGGTGGGCTGTGGTGAGTGGAGGTTTTCCACGCCAC  
 GGAAGTAGCCCAGGCTTGATGAACGATGACTTCCCGGGCGAGGGATGGAG  
 AACATTGTACCCACTCACGTGTGGGCACAGGTGATCCCGGCTGGAGCAAAGA  
 CTGTCATAGTTTGCTTCCTGCTTGGCCGTGACAATGACCCAGGCTCTCAGCC  
 CCCATGCACTTGCACTCCCCTCAGGGCCACATGGGGTGGGCTGGAGAAT  
 CCCAGGAATGTGTTGGAGCTGCTGACAGCACTTCATGCTCTGCGTGTGATCA  
 GCCCATGTGACTTCCTCAGGGAAGTGTGTGCCTGGTGGGCTCCAGCACCCCT

ATCCTGAATCTCCCAGGTCTTCTGATCCCCAGCGCTGGTGCTGAAGAGCGGG  
 ATGGGGTTGAGGGGATGCAGAGATGAAATGTAATGGGCAAATCTGCTTGCCC  
 ATGGCCACTCCACTTTGTTCTTCTTCCAGG

>gorGor3\_Gorilla US3\_914bp range=chr1:12145558-12146471 5'pad=0 3'pad=0  
 strand=- repeatMasking=none  
 CCTCACCCCTCTAGCCTGAACCCCCAGGTTTGTATTATATGGCTTGGGGCTTC  
 TTAATTTGTTATTTTTCTACCATTTGATTTCTGAGGTTTGGTGGGAACTTGGTG  
 ACATCTGGGCTTGTAATTAATAAAATACAAAGCAAAAAACCCGACAAAACATGT  
 TTGGTCTTTCTCTGTTTTGACTACACATTCCTCGAGGGGCAGGGACATTTGGGG  
 GTCACCTTCGTCCAACAGTGGTGAGTTCATGGTAGGTGTGAACAGGTGTTTG  
 CTAAACTAAGCCCAGGACGGTGAGAAGGGCGAGTGGGTCCCTCACCAGCAA  
 GAACCCTGGAGGATCTCTTAGGGGCGCCTGTCCCTGGCTGCCTGCCCACCC  
 TTTCCGAGAGGCCCTTTCTAACTCTCCTACCAGGGCCGGCAGACTGGGTCCAT  
 CCTGGAGCCCCGCTTGGTGGGCTGTGGTGAGTGGAGGTTTTCCACGCAACGG  
 GAAGTAGCCCAGGCTTGATGAACGATGACTTCCCGGGCGAGGGATGGAGAA  
 CATTGTACCCACTCACGTGCGGGCACAGGTGATCCCGGCTGGAGCAAAGACT  
 CTCATAGTTTGCTTCCTGCTTGGCCGTGACAATGACCCAGGCTCTCAGCCCC  
 CATGCACTTGACACTCCCCTCAGGGCCACATGGGGTGGGCTGGGAGAATC  
 CCAGGAATGTGTTGGAGCTGCTGACAGCACTTCATGCTCTGCGTGTGATCGG  
 CCCATGTGACTTCCTCAGGGAACGTGTGTGCCTGGTGGGCTCCAGCACCCCTA  
 TCCTGAATCTCCCAGGTCTTCTGATCCCCAGTGCTGGTGCTGAAGAGCGGGA  
 TGGGGTTGGGGGGATGCAGAGATGAAATGTAATGGGCAAATCTGCTTGCCCA  
 TGGCCACTCCACTTTGTTCTTCATCCAGG

>ponAbe2\_Orangutan US3\_915bp range=chr1:218406306-218407220 5'pad=0  
 3'pad=0 strand=+ repeatMasking=none  
 CCTCACCCCTCTAGCCTGAATGAACCCCCAGGTTTGTATTATATGGCTTGGGG  
 CTTCTTTGTTATTTTTCTACCACTGATTTCTGAGGTTTGATGGGAACTTGGTG  
 AGATCTGGGCTTTGTAATTAATAAAATATAAAGCAAAAAAACCGACAAAACATG  
 TTTGGTCTTTCTCTGTTTTGACTACACATTCCTCAAGGGCAGGGACATTTGAG  
 GGTACCTTCGTCCAACAGTGGTGAGTTCATAGTAGGTGTGAACAGGTGTTT  
 GCTAAACTAAGCCCAGGACGGTGAGAAGGGCGAGCGGGTCCCTCACCAGCA  
 AGAGCCCTGGAGGATCTCTTAGGGGTGCCTGTCCCTGGCTGCCTGCCTACCT  
 TTTCCAAGAGGCCCTTTCTAACTCTCCTACCAGGGCCGGCAGACTGGGTCCAT  
 CCTGGAGCCCCGCTTGGTGGGTTGTGGTGAGTGGAGGTTTTCCACGCCACAG  
 GAAGTAGCCCAGGCTTGATGAACGATGACTTCCTGGGCAAGGGATGGAGAAC  
 ATTGTACCCACTCATGTGCGGGCACAGGTGATCCCGGCTGGAGCAAAGACTC  
 TCATAGTTTGCTTCCTGCTTGGCCGTGACAATGACCAAGCTCTCAGCCCCCAT  
 GCACTTGACACTCCCCTCAGGGCCACATGGGGTTGGCTGGGAGAATCCCAG  
 GAATGTGTTGGAGCTGCTGACAGCACTTCATGCTCTGCGTGTGATCGGCCCA  
 TGTGACTTCCTCAGGGAACGTGTGTGCCTGGTGGGCTCCAGCACCCCTATCCT  
 GAATCTCCCAGGTCTTCTGAGCCCCAGCGCTGGTGCTGAAGAGCAGGATGG  
 GATTGGGGGGGGATGTAGAGATGAAATTTAATGGGCAAATCTGCTTGCCCAT  
 GGCCACTCCACTTTGTTCTTCATCCAGG

>nomLeu1\_Gibbon US3\_913bp range=GL397361:5451378-5452290 5'pad=0  
 3'pad=0 strand=- repeatMasking=none

CCTCACCCCTCTAGCTTGAACCCCCAGGTTTGTATTATACGGCTTGGGGCTTC  
 TTA CTTTGTATTATTTTCTACCACTGATTTCTGAGGTTTGGTGGGAACTTGGTG  
 AGATCTGGGCTTTGTAATTAATAAAATACAAAGCAAAAAACCCGACAAAACATG  
 TTTGGTCTTTCTCTGTTTTGACTACACATTCCTTGAGGGCAGGGACATTTGGG  
 GGTACCTTTGTCCAACAGTGGTGAGTTCATGGTAGGTGTGAACAGGTGTTT  
 GCTCAACTAAGCCCAGGATGGTGAGAAGGGCGAACGGGTCCCTCACCAGCA  
 AGAGCCCTGGAGGATCTCTTAGGGGTGCCTGTCCCTGGCTGCCTGCCACCT  
 TTTCCAAGAGGGCTTTCTAACTCTCCTACCAGGGCCGGCAGACTGGGTCCAA  
 CCTGGAGCCCCGCCTGGTGGGCTGTGGTGAGTGGAGGTTTTTTCACGCCACGG  
 GAAGTAGCCCAGGCTTGATGAATGACGGCTTCCCGAGCGAGGGATGGAGAA  
 CAATGTACCCACTTATGTGCGGGCACAGGTGATCCTGGCTGGAGCAAAGACT  
 CTTGTAGTTTGCTTCCTGCTTGCCCGTGACAATGACTCAGGCTCTTAGCCCCA  
 TGCACCTTGACACTCCCCTCAGGGCCACATGGGATGGGCTGGAGAATCCAG  
 GAATGTGTTGGAGCTGCTGACAGCACTTCATGCTCTGCGTGTGATCGGCCCA  
 TGTGACTTCCTCAGGGAAGTGTGTGCCTGGTGGGCTCCAGCACCCCTATCCT  
 GAATCTCCAGGTCTTCTGAGCCCCAGTGCTGGTGCTGAAGAGCAGGATGGG  
 GTTGGGGGGATGCAGAGATGAAATTTAATGGGCAAATCTGCTTGCCCATGGC  
 CACTCCACTTTGTTCTTCATCCAGG

>rheMac2\_Rhesus macaque US3\_889bp range=chr1:14985336-14986224

5'pad=0 3'pad=0 strand=- repeatMasking=none

TCTCACCCCTCTAATCTGAACCCCCAGGTTTGTATTTTATGGCTTGGGGCTTTTT  
 ACTTTGTTATTTTCTACCCACTGATTTCTGAGGTTTGGTGTGAAAATTGTTGA  
 GATCTGGGGTTTGTAAATTAATAAAATACAAAGCAAAAAACTCGACAAAACATGC  
 TTGGTCTTTCTCTGTTTTGACTACACATTCCTCGAGGGCAGGGACATTTGGGG  
 GTCGCCTTTGTCCAACAGTGGTGAGTTCATGGTAGGTGTGAACGGGTGTTTG  
 CTAACCTAAGCCCAGGGCGGTGAGAAGGGTGAGCAGGTCACTCACCGGCAA  
 GAGCCCTGGCTGCCTGCCACCTTTTCCAAGAGGCCTTTCTAACTCTCCTACC  
 AGGGCCGGCAGACTCGGTCCATCCTGGAGCCCATTGTTGGTGGGCTGTGGTGA  
 GTGGAGGCTTTCCATGCCACGGGAAGTAGCCCAGGCTTGATGAACGATGCCT  
 TCCCGGGCGAGGGATGGAGAACAATGTACCCACTTATGTGCGGGCACAGGT  
 GATCCTGGCTGGGGCAAAGACTCTCGTAGTTTACTTCCTGCTTGCCCGTGAC  
 AATGACCCAAGCTCTCAGGCCCCAGGCACACTTGACACAGTGCCTCAGGGCC  
 ACACGGGGTGGGTTGGAGAATCCCAGGAATGTGTTGGAAGTCTGACAGCAC  
 TTCATGCTGTGCGTGTGATCGGCCCATGTGATTTCCGCAGGGAACCGTGTGC  
 CTGGTGGGCTCCAGCGCCCCTATCTTGAACTCCAGGTCTTCTGAGCCCCA  
 GCGCTGGTGCTGAAGAGCAGGATGGCGTTGCAGGGGATGCAGAGATGAAAT  
 TTAATGGGCAAATCTGCTTGCCCATGGCCACTCCACTTAGTTCTTCATCCAGG

>equCab2\_Horse US3\_839bp range=chr2:39780448-39781286 5'pad=0 3'pad=0

strand=+ repeatMasking=none

CCTCCCCCTAGCCTGCACGTGCACGTTTTTATGATGTGGCTCAAGGCTTTCTC  
 TTCTGTTACTTTTTGATCACTGATTTCTGGGTTTTGGGAGAAAATTTGTGAGA  
 TCTGGCCTTTGTAATGAATAACATAGCAAAGCAAAATACAACAAAAAAATGTA  
 TTGGTTTTTCCCTCCTTCTTCACGACAAATTCCTTGAGGGCAGGGACATTTTG  
 GGGTCCCCTCTGCCCAGCAGAGTGTGAGGCTCGTGGTTGGTGTACTGACGC  
 TTGCTGAGCCCCAGGGAGTTGGGGGAAGACCCAGCCTGTCTCTCAGAAGCAG  
 GAGGGCCCCGAGGAGCTCTTAGGGGGCGCCCGTCCTGGGCCGCTCTCCCTTC  
 CCTGAGAGGTTCTCCAGCTCTCCTACCGGGAACAGATGCTGGTGTGTTGGTG



GAAGTGGCCCCAGGCTCGGCTGGCGGTGCCTGCAGGGATTGGGATGGGAG  
 GACCTCAGTGCCTCGTGCGGGACCTCGGTTATTCTGCACTGGGCAAAGACGT  
 CCTGTGTGATGGCAGCTCAGGCTCTCATCACGCTTGACACGCGCACACTCC  
 CTTGGGGCCGGCACGGGGTTGAAGAATTCCCGGAACGTGGCGGAGCTGCTG  
 ACAGCACTTCATGCTCGGCGTGTGATCACCCATGTGACTTCCTCCGGGAACC  
 GTGTGAATAAAGCGTGGGGGGCGGGCCCCCGGCACCCGTCTCCTGAATCTCC  
 CAGGTCTTCTTAGCTCCAGGTCTGAGAAACATGGCAGGGCTGGAAAACAGTA  
 CAGGGGGCCCCCAGAGATGAAAGTCAACGATCGTCGTTAGCCGCCCCCAT  
 CAATCTTC

>bosTau6\_Cow US3\_752bp range=chr16:42671961-42672712 5'pad=0 3'pad=0  
 strand=+ repeatMasking=none

GGAAGTCCCTCCTTGGTTATTTTTCTATCACTTATTTCTGGATTTTGGCCAGAA  
 AACTCGTGAGATCTGGCCATCACATTTGATAACATAGCAAAGTAAAATACCAC  
 AAGAAATGAACTGGTCATTCTCTTTCTTGATTACAAATTCCCTGAAATCAGGGA  
 CATTTGGGGCCTCCTTTACAACAGTGTTAGGATCATGGTGGGTGTTGACAGAT  
 CTTTACTGAGTCCCAGGGATGGAGAAGGACCTGATCTGTCTCCCGGAAGCAG  
 GAGGCCGGGGAGGATGTCTTAGAGGTGACCATCCTGAGCTGCCCTGCCCTC  
 CTACTAGGAGGCAAACATGCTCCATCTGGCAGCAGTTTCTGGAGGGAGCAGC  
 CCTGGGCCTGGCAAGGGCATTGCTGGGATGTAGGATTTGAGAATGATGTGC  
 CCACATGGGGGTAGGTTATTCTGCACGGGAGGTGGGTGGGGTGCAAAGCCA  
 TCCTGTGTGATGGCAGCCCAGGCTCTCATCAGACTGCACACTCCCCTGGGTC  
 CCACACGGGGCTGAAGAATCCCTGGAACGTGGCAGAGCTGCTGATAGCACTT  
 GATGCTCTGCGTGTGATCAACCACGTGACTTCCTCAGGGAACCGTGTGAAGG  
 AAAGTCTGCCGGGCGGGCCCCAGCACCCCGATGGTGAATCTCCAATGTCCTC  
 TTGTTCCACCTCTGAGAAGCATGTTGGGGTTCTGGGAAACAGGGCACGGGG  
 GCCCAGAGATGATATCTAAT

>mm9\_Mouse US3\_972bp range=chr4:147339314-147340285 5'pad=0 3'pad=0  
 strand=+ repeatMasking=none

CCTGCCTCTTCTAGAGATAACTTCCTGTTTTCTTCGTTACATACCTTGGGGCTT  
 TTAACTTTACTGTTTTGGGGAGATTTTTTAATTTTTATTTTCTACCACTGGCTTC  
 TGGGTTTGGGTGGTCAGGTGTGAAAGCCAGCCTTTACCATCATCCTAGTAAAA  
 AAAACACCACCAACAAAAATTATTGGTCTATTCTGTGTGTGTATGTGTGTGGA  
 GGGGAGGTGGGGGTAAATAATCCATGCTTGGACTCACTCTGTAGCCCGAGCTG  
 ACAGGCCACTTCTCTTTACACTCTTGGGTGCAGGGATCACACACACCTGCT  
 GGTCTTTCCTGACTTAGACTCCTGGAGAGCAGAGACCTTTTGGGTCCCCTTCT  
 TCCAGTAGGGTACAGAACTCCTGTGGGTGTCCGTAGTTTTTGTGAGCTCAG  
 CTCTTCCCTAGCATCTTCCAGGGACCCTCATCCCCAGGGGTACTCTTTACCCA  
 CCAGGGCTGGCAAACACAGTGACTGCACCCTGCACTGGGGCATGGGGTGGG  
 TAGAGGCCTACTCTGGGCTCCATGAGTGGTGTCTGCTTAAGCAGGACATGGG  
 AGAGTGGCAATGCCAATGTGTGCACGTACCTGTACCTGCACAGAGCACTTT  
 GCCCGTTCTTTCCTTCTGTCTGACTGTGACTGCAGCTCTGACTCTTGTCCAA  
 GCACTTGCAGGCTCCTCTGGGTTCACGTGGGTAGTGGGCCGAAGAATTCCA  
 GGAACGTGTTACAGCTGCTGACAGCACTTCACTCTCTGCCTGTGACCTGTCC  
 ATGTGACTTCCTCCAGAACTATGTGAAGAGGAGCGTTGAGGGTGGGCAGCAG  
 CACCCTGACTAAATATCCAAAGACTCCTGGACTCCAGCTGTACTCCTGAGAAG  
 CAACACCATACGGGGCTGGGGGTGGACCCACAGTGGTCACAGCTGGCTGTC  
 AGTAACCAAGCCCCTTAGGCTTCCAGG

No Zebra finch sequence

```
>hg19_Human US4_415bp range=chr1:11942848-11943262 5'pad=0 3'pad=0
strand=- repeatMasking=none
CCACTCCACTTTGTTCTTCATCCAGGGAGGGGTGGCCTAGGCATGGTGGCCA
GGGCTTGGCTGTGCACAGGGAACAGGAAGCCGTGAGTGGGAGTGGCCAGG
GGAGGCGGGTGGCGCTCACTGCCTACAGCAGGTGTGGCCATGGTGCTGACA
GGTCCAGCTTATCAGGGCTGGAGGCCAGGCTCCAGACGTGCAGGCTGTGG
GGCTTTATCAGCCTTTAGAGCGCCAGAGTTTGTGGCAATCCTGCCAGCCATG
GGTGCTGACAGCCAGGAGCTAGGCGGAGTACAGCTTCCTCTCTTGGCCTCCC
TGCTCCCAGCCTCAAGGCCGGGGTTCACTGCAGGGACATTTGAGGAGAG
GAGAGATGGCAGGGAGGAGAGGGAGGAGGAGATGGGCCCAGAAGCTTGTTT
CTCCT
```

```
>panTro3_Chimpanzee US4_415bp range=chr1:12032888-12033302 5'pad=0
3'pad=0 strand=- repeatMasking=none
```

CCACTCCACTTTGTTCTTCTTCCAGGGAGGGGTGGCCTAGGCATGGTGGCCA  
 GGGCTTGGCTGTGCACAGGGAACAGGAAGCCATGAGTGGGAGTGGCCAGGG  
 GAGGCGGGTGGCGCTCACTGCCTACAGCAGGTGTGGCCATGGTGTGACAG  
 GTCCACCTTATCAGGGCTGGAGGCCCAGGCTCCAGACGTGCAGGCTGTGGG  
 GCTTTATCAGCCTTTAGAGCGCCAGAGTTTGTGGCAATCCTGCCAGCCATGG  
 GTGCTGACAGCCAGGAGCTAGGCGGAGTACAGCTTCCTCCCTTGGCCTCCCT  
 GCTCCCAGCCTCGAGGCCAGGGTTACATTGCAGGGACATTTGAGGAGAGG  
 AGAGATGGCAGGGAGGAGAGGGAGGAGGAGATGGGCCCAGAAGCTTGTTTC  
 TCCT

>gorGor3\_Gorilla US4\_415bp range=chr1:12145169-12145583 5'pad=0 3'pad=0  
 strand=- repeatMasking=none

CCACTCCACTTTGTTCTTCCATCCAGGGAGGGGTGGCCTAGGCATGGTGGCCA  
 GGGCTTGGCTGTGCACAGGGAACAGGAAGCCGTGAGTGGGAGTGGCCAGG  
 GGAGGCAGGTGGCGCTCACTGCCTACAGCAGGTGTGGCCATGGTGTGACA  
 GGTCCAGCTTATCAGGGCTGGAGGCCCAGGCTCCAGACGTGCAGGCTGTGG  
 GGCTTTATCAGCCTTTAGAGCGCCAGAGTTTGTGGCAATCCTGCCAGCCATG  
 GGTGCTGACAGCCAGGAGCTAGGCGGAGTACAGCTTCCTCCCTTGGCCTCC  
 CTGCTCCCAGCCTCGAGGCCGGGGTTACATTGCAGGGACATTTGAGGAGA  
 GGAGAGATGGCAGGGAGGAGAGGGAGGAGGAGATGGGCCCAGAAGCTTGT  
 TTCTCCT

>ponAbe2\_Orangutan US4\_415bp range=chr1:218407195-218407609 5'pad=0  
 3'pad=0 strand=+ repeatMasking=none

CCACTCCACTTTGTTCTTCCATCCAGGGAGGGGTGGCCTAGGCACGGTGGCCA  
 GGGCTTGGCTGTGCACAGGGAACAGGAAGCCTTGAGTGGGAGTGGCCAGGG  
 GAGGTGGGTGGAGCTCACTGCCTACAGCAGGTGTGGCCGTGGTGTGACAG  
 GTCCAGCATATCAGGGCTGGAGGCCCAGGCTCCAGACGTGCAGGCTGTGGG  
 GCTTTATCAGCTTTTATAGAGCGCCAGAGTTTGTGACAATCCTGCCAGCCATGGG  
 TGCTGACAGCCAGGAGCTAGGCGGAGTACAGCTTCCTCCCTTGGCTTCCCTG  
 CTCCTAGCCTCGAGGCCGGGGTGCACATTGCAGGGACATTTGAGGAGAGGA  
 GAGATGGCAGGGAGGAGAGAGAGGAGGAGATGGGCCCAGAAGCTTGTTTCT  
 CCT

>nomLeu1\_Gibbon US4\_429bp range=GL397361:5450975-5451403 5'pad=0  
 3'pad=0 strand=- repeatMasking=none

CCACTCCACTTTGTTCTTCCATCCAGGGAGGGGTGGCCTAGGCATGGTGGCCA  
 GGGCTTGGCGGCCAGGGCTTGGCTGTGCACAGGGAACAGGAAGCCCTGAGT  
 GGGAGTGGCCAGGGGAGGGGGGTGGCGCTCACTGCCTACAGCAGGTGTGG  
 CCGTGGTGTGACAGGTCCAGCTTATCAGGGCTGGAGGCCCAGGCTCCAGA  
 CGTGCAGGCTGTGGGGCTTTATCAGCCTTTAGAGCGCCAGAGTTTGTGGCAA  
 TCCTGCCAGCCATGGGTGCTGACAGCCAGGAGCTAGGCGGAGTACAGCTTC  
 CTCCTAGGCCTCCCTGCTCCCAGCCTCAAGGCCGGGGTGCACATTGCAGG  
 GACATTTGAGGAGAGGAGAGATGGCAGGGAGGAGAGGGAGGAGGAGATGG  
 GCCCAGAAGCTTGTTTCTCCT

>rheMac2\_Rhesus macaque US4\_413bp range=chr1:14984949-14985361  
 5'pad=0 3'pad=0 strand=- repeatMasking=none

CCACTCCACTTAGTTCTTCATCCAGGGAGGGGTGGCCTAGGCACGGTGGCCA  
 GGGATTGGCTGTGCACAGGGAACAGGAAGCCCTGAGCGGGAATGGCCAGGG  
 GAGGCGGGTGGCGCTCACTGCCTACAGCAGGTGTGGCCGTGGTGCTGACAG  
 GCCAGCTTCTCAGGGCTGGAGGCCAGGCTCCAGAAGTGCAGGCTATGGG  
 GCTTTATCAGCCATTAGAGCGACAGTTTGTGGCAATCCTGCCAGCCATGGGT  
 GCTGACAGCCAGGAGCTAGGCGGAGTACAGCTTCCTCCCTTGGCCTCCCTG  
 CTCCCAGCCTCGAGGCCGGGGTGCACATTGCAGGGACATTTGAGGAGAGGA  
 GAGATGGCAGGGAGGAGAGGGAGGAAGAGATGGGCCCAAGAAGTTTGTCTTCT  
 CCT

>equCab2\_Horse US4\_364bp range=chr2:39783064-39783427 5'pad=0 3'pad=0  
 strand=+ repeatMasking=none

TCATCTCAAGGTGACTGTGGCCTGGCCTAGGCACGGTGGCCAGGGCTTGGC  
 TGA AACAGGCAGCCGGAAGCCCAGAGCAGGGGTGGGCTCGGGGAGGCCA  
 GGCCAGGAGCAGGTGTGGACACGGTGTGACAGGCCCAACTTATCAGGACC  
 AGAGGCCCAGGCTCCAGACGAGCAGGTCGTGGGGCTTTATCAGCCGTGAGA  
 GTGACAGAGTTTGCAACCATCCCGCTGGCCTGGGTGCTGACAGCAGAGCCG  
 GGCCAGGGCCTGCGGGTGCCACCGCCGGCGGAGGCGTGTTGCTGGGAA  
 GAGGAGAGGCTGGCGGGGAGAGGAGAGAGAGACGGAGATGAGCGTGGGCT  
 TGCTTTTTTC

>bosTau6\_Cow US4\_395bp range=chr16:42675496-42675890 5'pad=0 3'pad=0  
 strand=+ repeatMasking=none

TCATCTCAAGGTGATTGTGGCCTGGCCTAGGCACGGTGGCCAGGGCTTGGCT  
 GTAAACAGGCAACAGGAAGCCCAGAGCAGGGATGGGCCTCGGGAGGCTGAG  
 CCAGGAGAAGGTGTGGACGCAGTGCTGACAGGCCCAACTTATCAGGACCAG  
 GAGCCCAGGCTGCAGGCGAGTGGTTTGTGGGTCTTTATCAGCCGTTAGAGTG  
 ACAGAGTTTGCAACAATCCCGCTGGCCATGGGTGCTGACAGCCAGGAGCCTG  
 GCCGGTGGTGGAGCACAGCTTCTGCTCAGAACCCTGGCTTCCCGCTGCAGG  
 GTGGGAGGTATACTCTGCTGGGACAGTAGAGGAGAGGATGGGCAGGAGAAG  
 GAGGAAAAGAAAGAGATGATCAGAGAGGCTTGCTT

>mm9\_Mouse US4\_453bp range=chr4:147343469-147343921 5'pad=0 3'pad=0  
 strand=+ repeatMasking=none

CCTCCCCTCCTTCTTCTTGTCTTGTGGCTGGCCCCCTCGGGTCACCTCAAG  
 GTGTCCAGCAGTGGCCGTAACCAGGCAGCCTGGAGCCCAGAATGGATACCG  
 GGGAGGCTGCAAGAACACAGCAGTATGGACGTTTGCTGACACTTGCTGACAA  
 CTCGGACTTATCAGGGTGGGAGGCCGGGGCTCCAGACCTGCAGGCTTGTGG  
 GGCTTTATCAGCTGCTAACGTGACAGAGTTCACAGCAATGCTGTGGCTTCCAC  
 TGGTGCTGACAGCCAGTAGCTTCGGGAAGGCAACTTCTCCACACCACCAGCT  
 CCCAGCCACCAGGGAAGCAAGGCAAGCCAAACCCAAAAGGGAGGTGTATGC  
 CCCCCAGGGACACTGGAGGAGAAGAGCTACTGTTCTCCAGCCGGGGGTCTCG  
 GGGCAGGGGTTGGGATCATGAACTGAGGGGCTGGTTTTCT

>rn4\_Rat US4\_439bp range=chr5:165044736-165045174 5'pad=0 3'pad=0  
 strand=+ repeatMasking=none

CCTCCCCCTCCTTCTTCTTGTCTTGTGGCTGGCTCCCTCAGGTCACCTCAAG  
 GTGTCCAGCAGTAGCCATAAACAGGCAGCCTGGAGCCCAGAATGGATGCCAC  
 GGGAGGCTGCAAGAACACAGCAGTATGGATGTTTGCTGACACTTGCTGACAA

CTCGGAGTTATCAGGGTGGAGGCCAGGCTCCAGACCTGCAGGCTGTGGGG  
 CTTTATCAGCTGCTAGAGTGACAGAGTTCACAGCAATGCTGTGGCTTCCACAG  
 GTGCTGACAGCCGGTAGCTCCGGGAAGGCAACTTCTCCACACCACCAGCTCC  
 CAGCCACTGGGGAGGCTAGGAGAGCCAGGCCCAAGTGGGAGGTGTATACCC  
 CCCAGGGACACTGGAGGAGAAGAGCTAGGGTGGGGGGCAGGGGCTGTGAT  
 CATGAGCTGAGGGGCTGATTTTCT

>monDom5\_Opossum US4\_402bp range=chr4:365417258-365417659 5'pad=0  
 3'pad=0 strand=+ repeatMasking=none  
 TGAGGTCCTGGGCTTGGCAGGGGCCAGGCAGCCCCAAGCAAAGGGAGAGAA  
 TGGGAGGGCAGAGGCAGGAGGCGTCTCTGAGGAGCTGACAGCTTCCTTTATT  
 GGCCTTATCTAGAGCATGAGCACCGGCTCCAGCCTCGCAGTCCCCGGGGCT  
 TATCGGTCTTTCCGAGTGTGAGGGTTTGCAGCACTGCTGCCCTGAGCTATGC  
 CTGCTGACAGCTGGGAGCTGTGTGGTGAAGTTGGGGTGAGGAGGGGGGAGAA  
 GATGGGCATTTCTCTTGGGTCTTCATTGCCTACCTCGCCTTAGAAGCTGGGG  
 CTGTCTGAATGACGGGTGGCTCATCACCTTGAGCTGATGTTCTGGGGGACGT  
 GAGGAACAGAGAAAAGAATAAGGAGGGGATGGGGAGAGAAG

>galGal3\_Chicken US4\_225bp range=chr21:5746082-5746306 5'pad=0 3'pad=0  
 strand=+ repeatMasking=none  
 GGCTCCAGCCCTGTAGCCTGAGCACCTTATCACAGCTTTAGAAGTGTCAGTTT  
 TTGAAACGGTACTCGCCCATCTCGCCGTGCTGACAAGCAGTGGCTAAAATAT  
 CCTGCCCCTCCACCACATAAGGATGGAGCTATTTCCAGGAGCTTGGCGAACA  
 CTGAGTATTTTCTGGGAAAACAAAGAAGGGCTGTCAAATCAAGAACAGTGGGT  
 GATAAGAATCACCAT

>melGal1\_Turkey US4\_225bp range=chr23:5777172-5777396 5'pad=0 3'pad=0  
 strand=+ repeatMasking=none  
 GGCTCCAGCCCTGTATCCTGAGCACCTTATCACAGCTTTAGAAGTGTTAGTTT  
 TTGAAACGGTCCTCGCCCATCTCGCTGTGCTGACAAGCGATGGCTAAAATATC  
 CTGCCCCTCCACCACATAAGGATGGAGCTATTTCCAGAAGCTTGGCGAACAC  
 TGAGTATTTTCTGGGAAAACAAAGAAGGGTTGTCAAATCAAGAATAGTGGGTG  
 ATAAGAATCACCAT

>taeGut1\_Zebra finch US4\_250bp range=chr21\_random:97953-98202 5'pad=0  
 3'pad=0 strand=+ repeatMasking=none  
 GCCTGCAGCCCTGTAGTCTGAGCACCTTATCACAGCTTTAGGAGTGTTAGTTT  
 TTGAAAGGCTCCTTGCCAATCACGCTGTGCTGAGAAGCAGCAGCTAAAATATC  
 CTGCCCATCCAGCCCACAGCCATGCCAGCCTCCACCACAAAAGGCTTCAGCT  
 ATTTCCAGAAGCTTGGCAATCACACTGAGTATTTTCTGGGAAAACAAAGAAAG  
 GTTGTCAAATCAAGAACAGTGGGTGATAAGAGCCACCAC

### 4.11 Figure legends

**Figure 1. Localization by phylogenetic footprinting of four potentially functional ECRs upstream of the *Nppb/Nppa* locus across three mammal species.** (A) Adapted smooth-graphic representation of the *Nppb/Nppa* locus conservation profiles computed by the web-based Mulan algorithm through the local alignments of the *Nppb/Nppa* syntenic genomic regions collected from three mammal species (*Homo sapiens* (hg19), *Mus musculus* (mm9) and *Rattus norvegicus* (rn4)), and using the mouse sequence as the reference genome. The ECRs, represented here as dark red blocks on top of each species pair (human vs. mouse and rat vs. mouse) conservation profiles layers, were detected as regions of high sequence identity by setting 2 parameters: ECR length ( $\geq 100$  bp) and similarity ( $\geq 60\%$ ). The horizontal axis represents the relative scale in kilobases of the mouse reference sequence, whereas the vertical axis represents the % of identity between the reference and the aligned paired sequences (human or rat). The ECRs shared among all 3 species are indicated by arrowheads (red, purple, and black). In order to detect the potentially functional ECRs, the multiTF software, dynamically interconnected to the Mulan program, was then run to identify the evolutionary conserved TFBSs clustered within the ECRs and shared among the 3 species. Other than the ECRs present in the promoters (black arrowheads), within coding genes, or in the 3'UTR of genes, only 4 intergenic ECRs (US1, US2, US3, and US4) (purple arrowheads) were enriched with multiple conserved TFBSs. All the other ECRs (red arrowheads) had either less than three or no conserved TFBSs. (B) Schematic representations of some putative TFBSs spatially arranged within the 4 potentially functional ECRs. BRE = Bone Morphogenetic protein Response Element; ClZ = Cas-Interacting Zinc finger protein BS (BS = Binding Site); EF1 = EF1 BS; GATA = GATA factors BS; Ebox: Ebox BS; EGR: Egr/Krox BS; ERE = Estrogen Receptor Response Element; KLF = Krüppel-Like Factor BS; MARE = Maf Recognition Element; MEIS = MEIS BS; MRE = MEF2 Response Element; MycMax = c-Myc/Max BS; MZF1 = MZF1 BS; NBRE = Nerve growth factor induced-B Response Element; NERF = New Ets-Related Factor BS; NFkB = NFkB BS; NKE = Nkx factors response Element; SRE = Serum Response factor

Element; TBE = T-box Binding Element; TEF = TEF BS; ZF5 = Zinc Finger 5 BS. Blue arrows represent primers used in ChIP assays.

**Figure 2. Basal and stimulated states of the four mouse ECRs in different cell types.** (A) Basal activity of the four mouse ECRs, cloned upstream of the luciferase reporter gene of the pXP2 vector, were determined in transient transfections carried out in primary cultures of 4 days old neonatal rat ventricular cardiomyocytes, in NIH 3T3 cells and C2C12 cells. Results are expressed as the fold activation relative to the basal activity of the -54 bp *Nppa* minimal promoter (Ctrl). (B) Comparison of the ability of Endothelin-1 or Phenylephrine to stimulate each ECRs in transient transfections carried out in primary cultures of 4 days old neonatal rat ventricular cardiomyocytes. Results are expressed as the fold activation relative to the basal activity (unstimulated) of each construct.

**Figure 3. Cardiac transcription factor recruitment to the *Nppb/Nppa* promoters and the CRMs in ventricular cardiomyocytes.** (A and B) ChIP performed in neonatal ventricular cardiomyocytes using  $\alpha$ -TBX5 and  $\alpha$ -GATA4 antibodies, followed by QPCRs to establish TBX5 and GATA4 occupancy of the *Nppa* and *Nppb* promoters (A), as well as US2, US3 and US4 modules (B). (C) ChIP performed using  $\alpha$ -TBX5 and  $\alpha$ -TBX20 antibodies, followed by QPCRs to determine TBX5 and TBX20 occupancy of *Nppa* promoter, as well as US2 and US4 modules. The data presents the fold enrichment for each chromatin region, normalized with the exon 3 region of *Pomc* gene (QPCR reference), of one representative ChIP experiment realized in duplicate.

**Figure 4. TBX5 binding to the *Nppa* promoter and US2 module TBE sites.** (A and B) EMSA were performed using nuclear extracts from 293T cells overexpressing Flag-TBX5, and  $^{32}$ P-labeled probes harboring the TBE site from either the *Nppa* promoter (TBE-*Nppa*) or the US2 module (TBE2-US2 (A) or TBE1-US2 (B)). The incubation of the nuclear extracts with each  $^{32}$ P-labeled probes confirmed the existence of a specific binding between TBX5 and TBE-*Nppa* as well as TBE2-US2 (A), as shown by the supershift of the TBX5/TBE complexes (ss TBX5) following the addition of the  $\alpha$ -Flag M2 antibody, and the disruption of the TBX5/TBE complexes by competition with excess (100x and 300x) cold

oligonucleotide harboring the TBE-*Nppa* or TBE2-US2 sites. No specific binding was observed between TBX5 and TBE1-US2 **(B)**. Ctl: Nuclear extracts of 293T cells transfected with the empty plasmid pCDNA3. **(C)** Schematic representation of the US2 *cis*-regulatory module harboring a SRE site and the two potential TBE sites (TBE1 and TBE2), where only TBE2 seems to exhibit some affinity for TBX5. Black arrows represent primers used in ChIP assays.

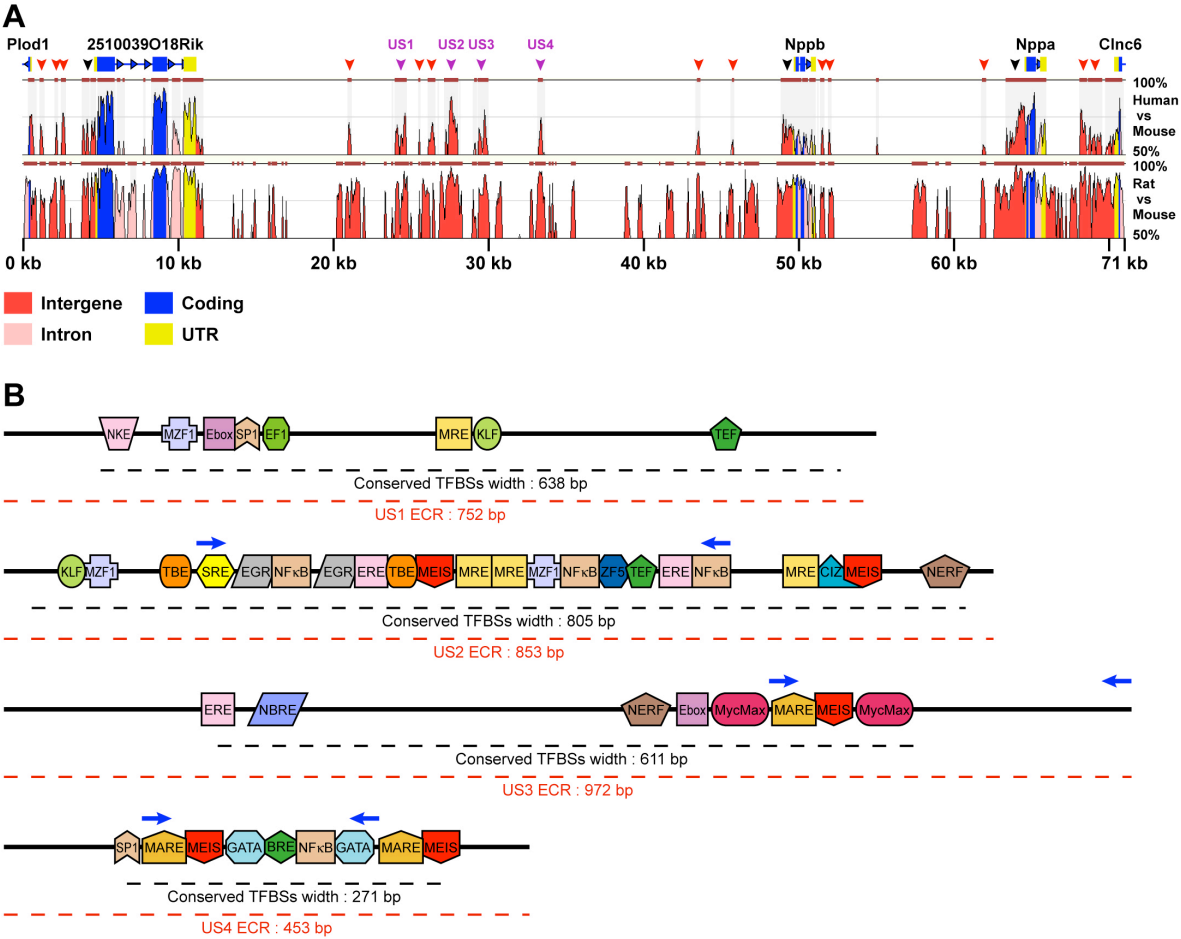
**Figure 5. SRF occupancy of the *Nppa* promoter and US2 module SRE site.** **(A)** ChIP performed in neonatal ventricular cardiomyocytes using the  $\alpha$ -SRF (G-20x) antibody, followed by a QPCR to establish SRF occupancy of the *Nppa* promoter, as well as the US2 module. The data presents the fold enrichment for each chromatin region, normalized with the exon 3 of *Pomc* gene (QPCR reference), of one representative ChIP assay realized in duplicate. **(B)** SRF activation of the US2 module, cloned upstream of the -54 bp *Nppa* minimal promoter, and the -54 bp *Nppa* minimal promoter, used as a control. Both constructs were cloned upstream of the luciferase reporter gene of the pXP2 vector. The results are the means  $\pm$  standard deviation of data from a representative transient transfection carried out in duplicate in C2C12 cells with increasing amounts of the *Srf* expression vector. Results are expressed as the fold activation relative to the basal activity of each construct. **(C)** EMSA were performed using nuclear extracts from 293T cells overexpressing SRF, and  $^{32}$ P-labeled probes harboring the SRE site from either the US2 module (SRE-US2) or the *Nppa* promoter (SRE-*Nppa*) which was taken as a control. The existence of a specific binding of SRF on the SRE-US2 site was confirmed by the supershift of the SRF/SRE complex (ss SRF) following the addition of the  $\alpha$ -SRF antibody, as well as the disruption of the SRF/SRE complex by competition with excess (100x and 300x) cold oligonucleotide harboring the SRE-*Nppa* or SRE-US2 sites. Ctl: Nuclear extracts of 293T cells transfected with the empty plasmid pCDNA<sub>3</sub>.

**Figure 6. Frequencies of transient transgenic embryos at E12.5.** **(A)** Frequency of positive embryos by PCR and LacZ expressing embryos at E12.5. Sagittal **(B)** and frontal **(C, D)** views of a whole mount X-Gal positively stained transgenic embryo at E12.5 for the rat *Nppa* promoter (-697 bp), which was tested

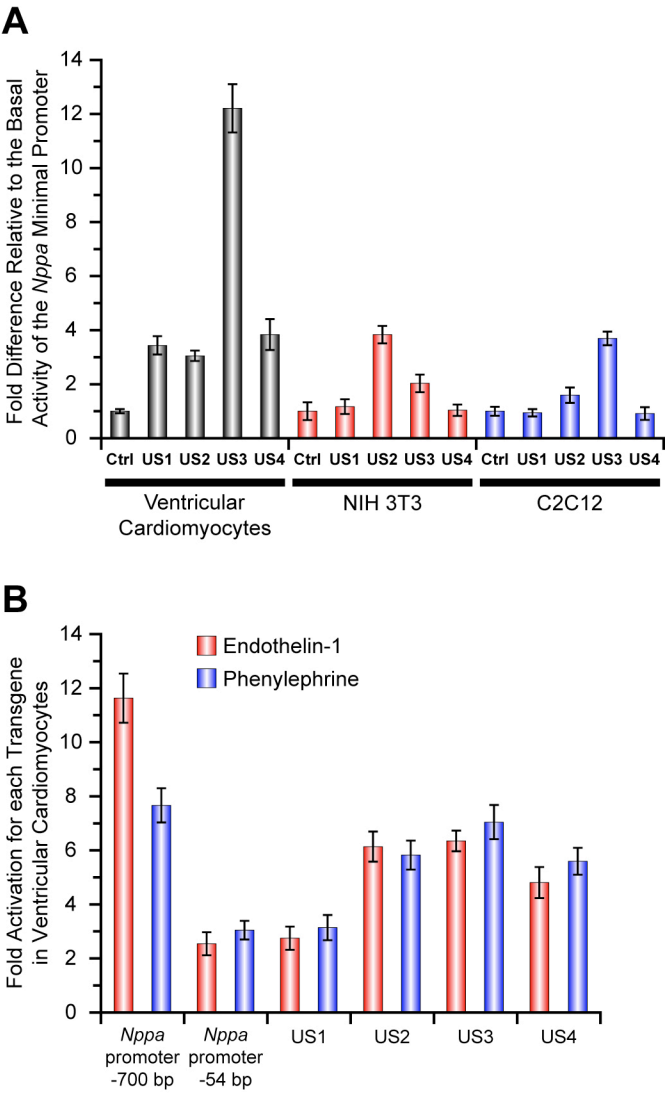


as a positive control. Note the cardiac-specific X-Gal staining in both atria and the left ventricle.

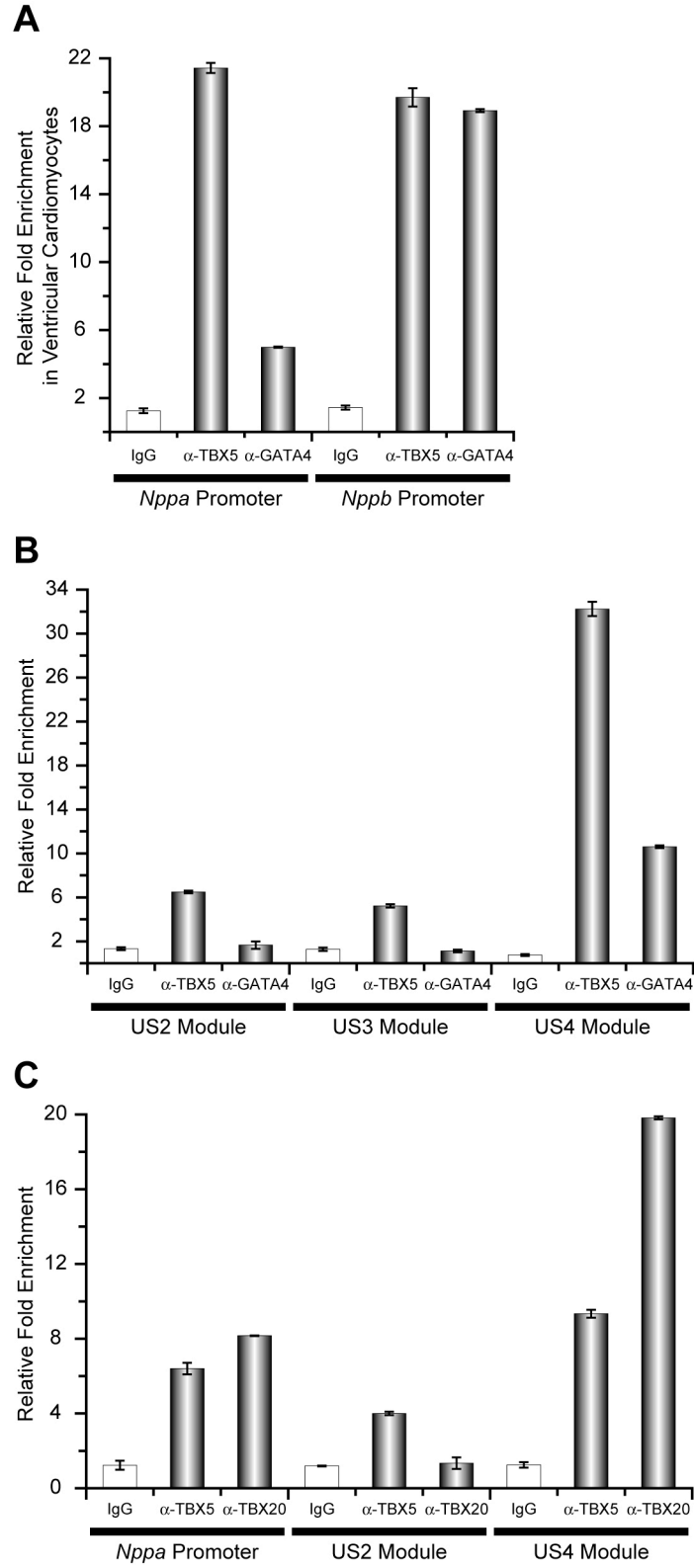
**Figure 7. US modules enhancer activity in transient transgenic embryos at E12.5.** Frontal views of a whole mount X-Gal positively stained transgenic hearts of embryos at E12.5 for the *Nppa* promoter -697 bp (A), US2 (B), US3 (C), and US4 (D) modules. Note the left ventricular X-Gal staining for all the constructs and the right ventricular specific X-Gal staining for the US3 module.



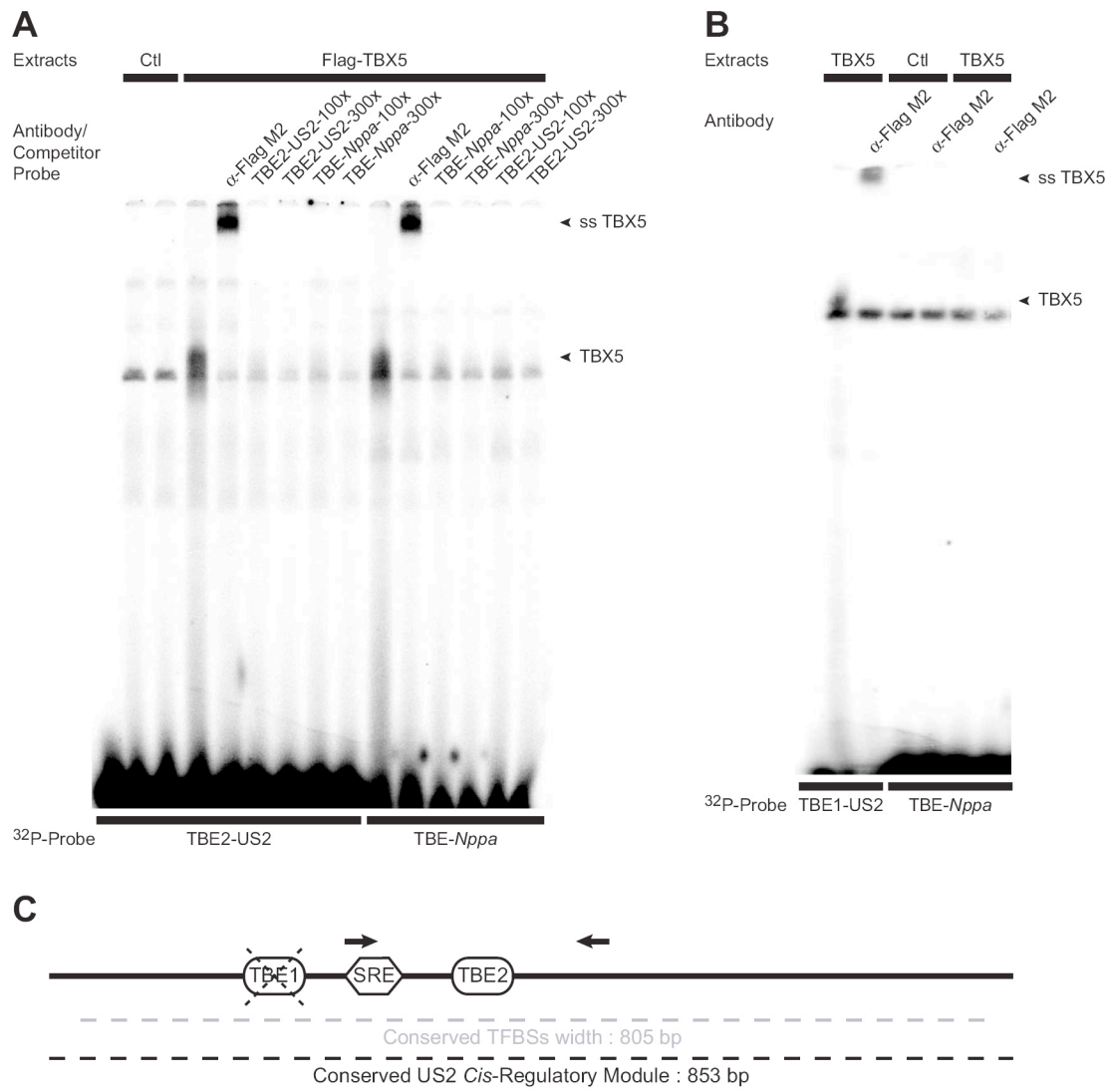
**Figure 4.1. Localization by phylogenetic footprinting of four potentially functional ECRs upstream of the *Nppb/Nppa* locus across three mammal species.**



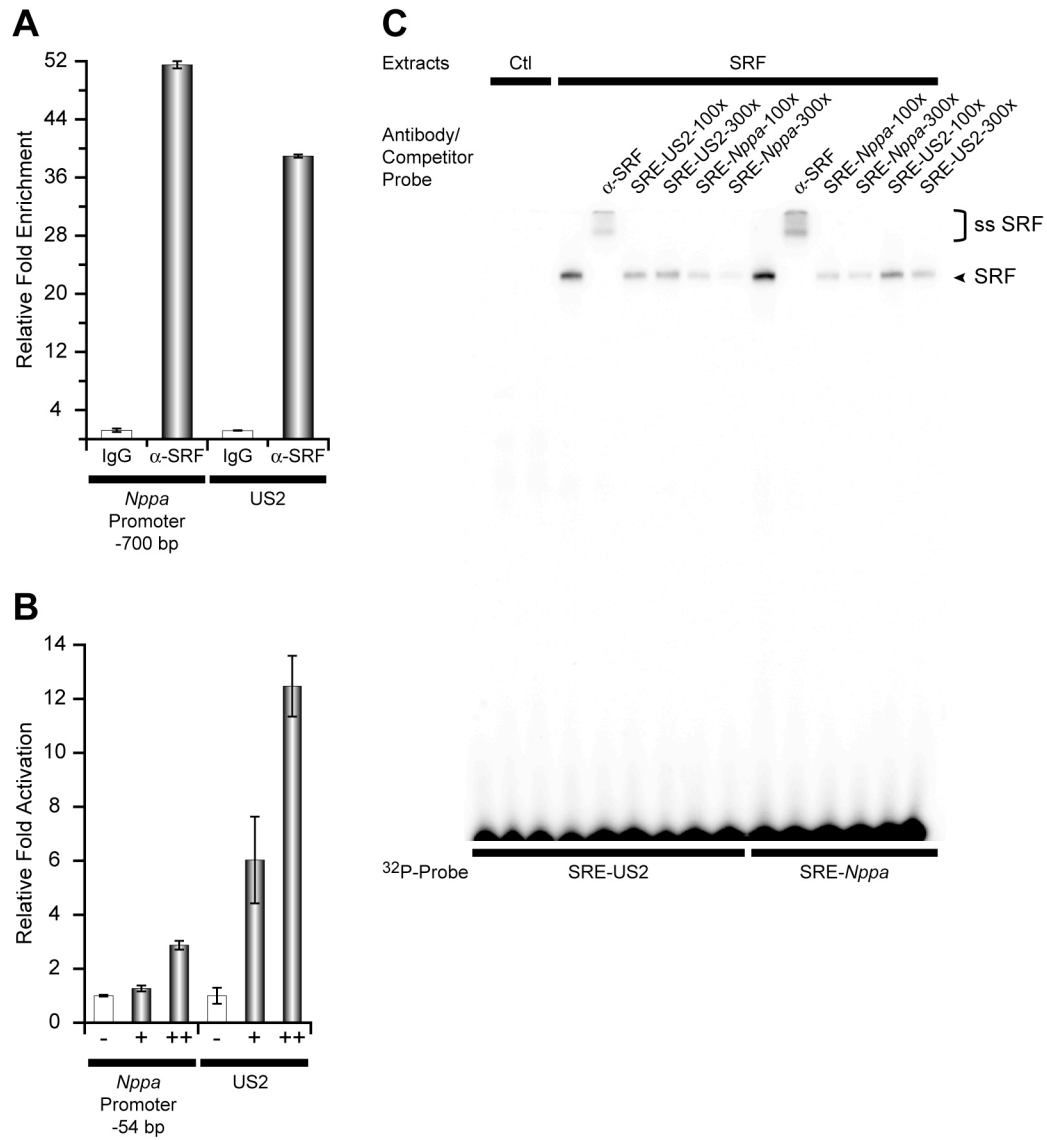
**Figure 4.2. Basal and stimulated states of the four mouse ECRs in different cell types.**



**Figure 4.3.** Cardiac transcription factor recruitment to the *Nppb/Nppa* promoters and the CRMs in ventricular cardiomyocytes.



**Figure 4.4. TBX5 binding to the *Nppa* promoter and US2 module TBE sites.**



**Figure 4.5.** SRF occupancy of the *Nppa* promoter and US2 module SRE sites.

A

	Number of Positive Embryos		
	Positive Genotype	Positive Staining (Heart)	Positive Staining (Heart + Ectopic Expression)
Nppa promoter	9	5	0
US1 module	22	0	0
US2 module	13	5	1 (Brain)
US3 module	16	7	0
US4 module	14	8	1 (Retina)

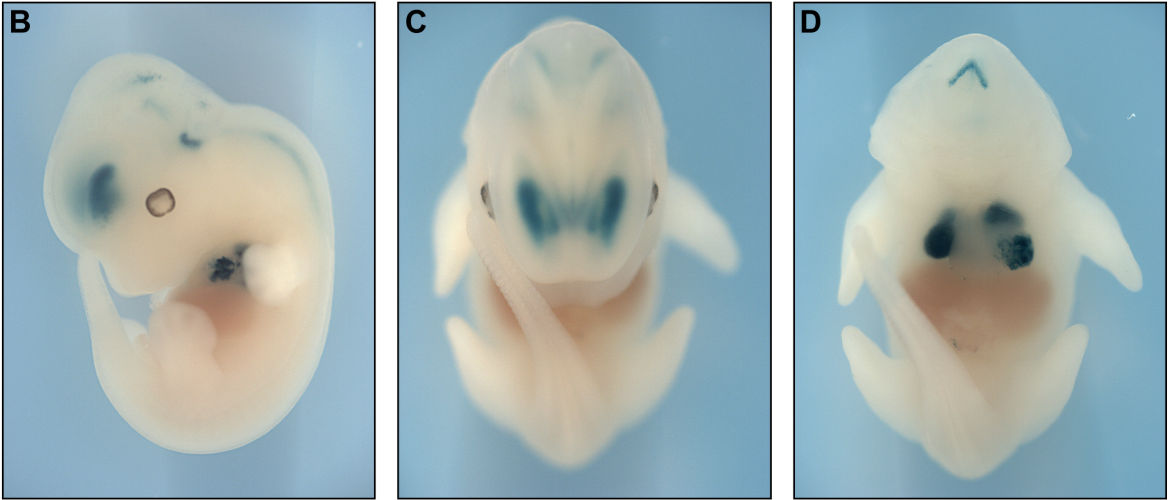
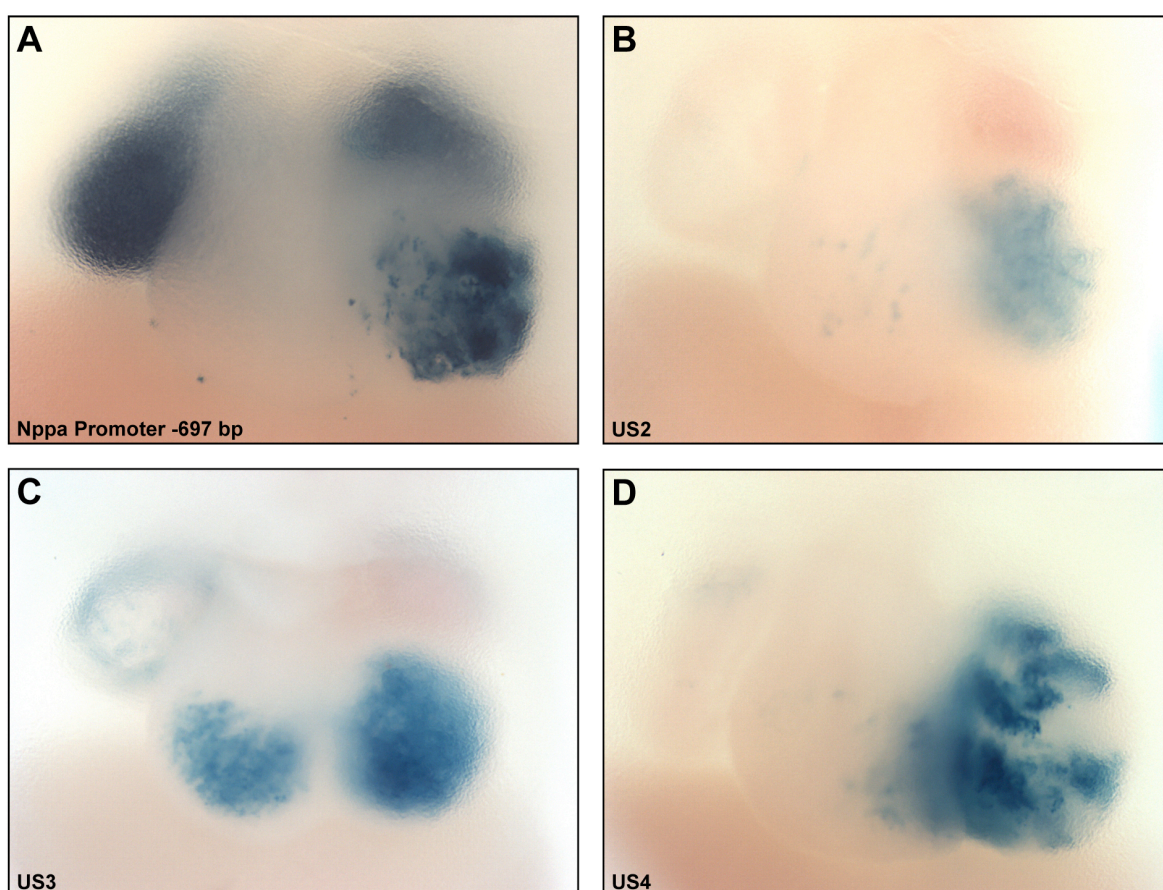


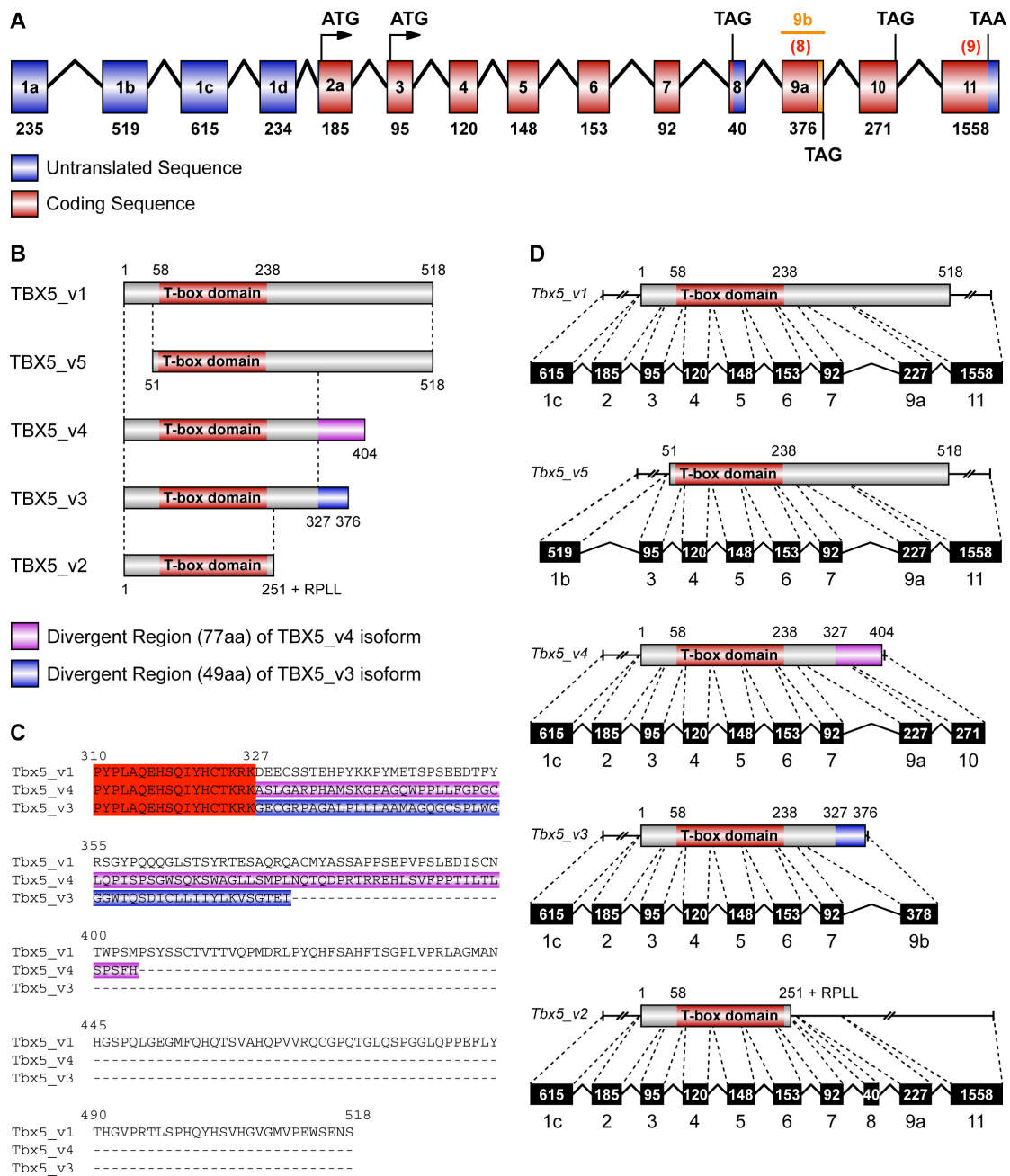
Figure 4.6. Frequencies of transient transgenic embryos at E12.5.



**Figure 4.7. US modules enhancer activity in transient transgenic embryos at E12.5.**



## Chapitre 5. Résultats supplémentaires



**Figure 5.1. Représentation des isoformes alternatifs de *Tbx5* chez *Mus musculus*.**

(A) Représentation génomique du locus de *Tbx5* chez *Mus musculus*. Les séquences non codantes (5'UTR et 3'UTR) sont en bleues, tandis que les séquences codantes sont en rouges. Le numéro des exons est inscrit dans chacune des boîtes, tandis que les chiffres en rouges entre parenthèses

correspondent à l'ancienne numérotation. **(B)** Représentation schématique des 5 isoformes alternatifs de TBX5. La région en rouge représente le domaine T-box (boîte T) de liaison à l'ADN de TBX5. Les régions en bleu (*Tbx5\_v3*) et en violet (*Tbx5\_v4*) représentent les extensions peptidiques divergentes de la région C-terminale des isoformes *Tbx5\_v1* et *Tbx5\_v5*. **(C)** Alignement peptidique d'une partie de la région C-terminale des 3 isoformes alternatifs *Tbx5\_v1*, *Tbx5\_v3* (bleu), et *Tbx5\_v4* (violet). **(D)** Représentation schématique de l'épissage alternatif des exons de *Tbx5* chez *Mus musculus*. *Tbx5\_v6* (non représenté) est identique à *Tbx5\_v1* à l'exception de la région 3'UTR qui est plus courte suite à la sélection d'un site de polyadénylation alternatif précoce au niveau de l'exon 11.

## Chapitre 6. Discussion

Une première étude présentée dans le présent travail a permis d'établir le rôle crucial de la sous-population de cellules endocardiques TBX5<sup>+</sup> dans la morphogenèse du septum inter-auriculaire. L'analyse des souris dont l'ablation de *Tbx5* cible spécifiquement les cellules de l'endocarde a permis de mettre en évidence le rôle décisif de *Tbx5* dans le maintien de la survie des cellules endocardiques et myocardiques constituant le septum primum, qui s'avère indispensable à la morphogenèse de la cloison inter-auriculaire [688]. Une autre étude réalisée en collaboration avec l'équipe de Benoit G. Bruneau illustre également l'importance de l'établissement du gradient d'expression ventriculaire cardiomyocytaire de *Tbx5*, au cours de l'évolution des vertébrés, dans la morphogenèse du septum inter-ventriculaire [499]. Une étude subsidiaire focalise davantage sur l'influence de l'épissage alternatif sur l'affinage des fonctions de *Tbx5* dans le cœur. L'analyse de la transcription de *Tbx5* durant l'embryogenèse chez la souris a mis en évidence l'existence d'au minimum six transcrits alternatifs. Un article résultant de ces études démontre clairement la divergence de fonction de deux de ces transcrits durant la cardiogénèse, l'isoforme long (*Tbx5\_v1* = *Tbx5a*) contribuant à la croissance des cardiomyocytes et potentiellement au " patterning " des différentes lignées cardiaques, tandis que l'isoforme court (*Tbx5\_v2* = *Tbx5b*) favorise un arrêt de la croissance cellulaire [687]. Aucun des isoformes tronqués de TBX5 ne semble agir comme un dominant négatif à l'égard de l'isoforme long TBX5\_v1. Par contre, l'amputation de certains des domaines fonctionnels au sein de ces isoformes alternatifs vis-à-vis de l'isoforme long TBX5\_V1, et la divergence de leur localisation subcellulaire suggèrent qu'ils détiennent des fonctions spécifiques subsidiaires à leurs fonctions communes. Les divergences de fonctions entre ces isoformes favorisent un affinage des activités ontogéniques du gène *Tbx5* et pourraient expliquer les variations de pénétrance et d'expressivité des malformations cardiaques et extracardiaques rencontrées chez les individus atteints du SHO. Finalement, un dernier article présente le décryptage de la topographie des MCRs au sein du locus *Nppb/Nppa* grâce à une approche bio-informatique d'empreinte phylogénétique [689]. La découverte de trois MCRs, dont un (US3) est spécifique aux euthériens, au niveau du tandem génique

*Nppb/Nppa* a permis de confirmer que d'autres éléments *cis*-régulateurs étaient requis afin de moduler l'expression ventriculaire de *Nppa* et *Nppb* durant la cardiogénèse. De surcroît, le recrutement de *Tbx5* au niveau de ces MCRs supporte l'hypothèse selon laquelle ces enhancers interprètent le gradient d'expression ventriculaire de TBX5, et de ce fait explique la concordance quasiment parfaite entre les profils d'expression de *Tbx5* et de ces deux gènes natriurétiques chez les mammifères.

## **6.1 Fonctions de *Tbx5* dans la genèse des septums cardiaques**

### **6.1.1 Fonctions endocardiques et myocardiques de *Tbx5* dans la genèse du septum inter-auriculaire**

La majorité des MCCs ont généralement une étiologie polygénique et/ou multifactorielle, et sont donc le résultat de multiples interactions de facteurs génétiques, épigénétiques, et/ou environnementaux. Toutefois, l'étiologie monogénique, généralement dominante, d'un sous-ensemble de MCCs a également été mise en évidence. L'identification des gènes responsables de MCCs demeure donc un objectif majeur à la compréhension des mécanismes moléculaires conduisant à ces affections cardiaques. Parmi ces gènes, *Tbx5* est qualifié de pléiotropique puisqu'il est impliqué dans une pléthore de fonctions morphogénétiques indispensables au développement de structures cardiaques et extracardiaques, comme en témoigne la variété de malformations cardiaques et des membres antérieurs répertoriées chez les différents patients humains atteints du SHO, causé par diverses mutations autosomiques dominantes de *TBX5* [507, 510]. La capacité du modèle murin d'haploinsuffisance de *Tbx5* à récapituler l'hétérogénéité clinique des malformations cardiaques et extracardiaques du SHO [481] a confirmé, de par l'homologie fonctionnelle des gènes *Tbx5* humain/murin, que la souris se révélerait un modèle incontournable à la détermination des fonctions cardiogéniques de *Tbx5*. Aussi, les études effectuées dans divers modèles animaux ont démontré le rôle crucial de *Tbx5* dans la morphogénèse des structures sino-auriculaires ainsi que certaines autres structures cardiaques, telles que le septum inter-auriculaire, le septum inter-ventriculaire, et le système de

conduction cardiaque [481]. Toutefois, hormis le rôle primordial de *Tbx5* dans la formation du sinus veineux et des oreillettes, illustré par l'hypoplasie généralisée des structures sino-auriculaires chez les souris *Ella-Cre;Tbx5<sup>-/-</sup>* [481], les fonctions auriculaires précises de *Tbx5* demeuraient entachées d'incertitudes.

Afin d'identifier les différentes propriétés fonctionnelles de *Tbx5*, une analyse approfondie de l'expression cardiaque de TBX5 a été effectuée grâce à des anticorps que nous avons générés. Cette étude a révélé l'expression protéique de TBX5 dans plusieurs précurseurs cardiaques, tels que la majorité des lignées cardiomyocytaires des oreillettes et des trabécules ventriculaires, ainsi qu'une sous-population distincte de cellules endocardiques et mésenchymateuses au niveau de la zone auriculaire des bourrelets endocardiques du canal AV à E12,5. Bien que l'expression cardiomyocytaire de TBX5 débute précocement vers E7,25, l'expression endocardique n'est initiée qu'entre de E12,0 et E12,5 dans une sous-population restreinte de cellules endocardiques et mésenchymateuses. L'existence d'au moins deux sous-populations endocardiques aux propriétés distinctes, l'une TBX5<sup>+</sup> et l'autre TBX5<sup>-</sup>, témoigne donc d'une étape de diversification tardive des cellules endocardiques à partir de E12,5. Afin d'étudier l'effet d'une activation précoce de l'expression de *Tbx5* dans les cellules endocardiques, des souris transgéniques *Tie2-Cre;CAT-Tbx5* ont été générées dans lesquelles la surexpression de TBX5, grâce au transgène *Tie2-Cre*, débute vers E8,5 et s'étend à l'ensemble des cellules endocardiques et mésenchymateuses vers E9,5 [690]. Ces embryons transgéniques *Tie2-Cre;CAT-Tbx5* succombent entre E9,75 et E10,5 d'insuffisance cardiaque sévère, caractérisée par la difformité de leur cœur associée à des effusions et œdèmes péricardiques. L'examen détaillé de ces cœurs mis en évidence une constriction auriculo-ventriculaire quasiment inexistante, des bourrelets endocardiques auriculo-ventriculaires acellulaires, une paroi endocardique décollée de la couche myocardique au niveau des cavités primitives auriculaires et ventriculaires, et une paroi myocardique ventriculaire monocellulaire comportant seulement quelques rudiments de trabécules qui semblent dégénérés tant les cardiomyocytes les composants paraissent désorganisés. L'absence d'expression de *Tbx5* dans les cellules endocardiques entre E8,5 et E12,5 semble donc requise pour ne pas interférer d'une part avec la

prolifération des cellules endocardiques et des cardiomyocytes, et d'autre part avec la migration et/ou l'initiation de la TEM des cellules endocardiques bordant les bourrelets endocardiques du canal AV. Au niveau des chambres cardiaques, l'incapacité de la paroi endocardique à border la paroi myocardique hypocellulaire pourrait résulter d'un défaut de prolifération de ces cellules empêchant ainsi au tissu endocardique de s'agrandir pendant la croissance volumique des cavités cardiaques. Ce mécanisme corroborerait le mécanisme cellule-non-autonome d'inhibition de la prolifération observé suite à la surexpression de *Tbx5* dans diverses lignées cellulaires et dans le myocarde [493, 691]. L'altération de la prolifération des cellules endocardiques et myocardiques supporte l'hypothèse de la production d'un signal paracrine qui serait induit par *Tbx5* au niveau des cellules endocardiques surexprimant ectopiquement ce facteur de transcription. Malgré les défauts des chambres cardiaques et l'inexistence partielle de la constriction du canal AV, l'accumulation de la gelée cardiaque au niveau des bourrelets endocardiques AV ne semble pas altérée, étant donné le ballonnement normal de la paroi endocardique au niveau du canal AV. Par contre, l'absence de cellules mésenchymateuses au niveau de ces bourrelets endocardiques indique un défaut de la prolifération, de la migration et/ou du processus de TEM des cellules endocardiques. Outre l'effet anti-prolifératif reconnu d'une surexpression de *Tbx5* [493, 691], l'altération de la TEM et de la migration, et donc de l'invasion de la gelée cardiaque par les cellules mésenchymateuses, ressemble fortement à l'obstruction de la TEM et de la migration cellule-autonome des cellules pro-épicaudales/épicaudales précédemment observés suite à des infections rétrovirales de ces cellules avec un transgène induisant la surexpression de h*TBX5* [495]. En fait, bien que la spécification des cardiomyocytes et des cellules endocardiques ne soit pas affectée, l'absence de la constriction du canal AV et des cellules mésenchymateuses au niveau des bourrelets endocardiques auriculo-ventriculaires évoquent le phénotype obtenu suite à l'inactivation de *Pdlim7* chez le poisson zèbre [692]. *Pdlim7*, aussi nommé LMP4, est une protéine cytoplasmique, de la famille de gènes PDZ-LIM, associée aux filaments d'actine, qui a la capacité de séquestrer *Tbx5* dans le cytoplasme [496, 693]. *Pdlim7* intervient donc dans la régulation dynamique de la distribution subcellulaire de *Tbx5*, ce qui permet de moduler la concentration nucléaire de *Tbx5* et par conséquent de réguler son

activité transcriptionnelle [496, 692-694]. L'inactivation de *Pdlim7* engendre une augmentation nucléaire de *Tbx5*, ce qui a pour effet d'étendre l'expression des marqueurs des chambres cardiaques au niveau des cardiomyocytes du canal AV, et d'inhiber la TEM des cellules endocardiques. Au contraire, l'inactivation de *Tbx5* chez le poisson zèbre entraîne une hypercellularité des bourrelets endocardiques, ce qui a pour conséquence un épaississement des valves du canal AV [692]. Le phénotype cardiaque obtenu suite à l'expression ectopique de *Tbx5* dans les cellules endocardiques confirme donc le rôle primordial d'une activation spatio-temporelle et quantitativement définie de l'expression de *Tbx5* afin de ne pas interférer avec la croissance du myocarde et la morphogenèse du tissu auriculo-ventriculaire. Toutefois, malgré ces résultats captivants, aucune fonction n'était encore associée à la soudaine expression régionalisée de *Tbx5* dans une sous-population de cellules des bourrelets endocardiques du canal AV.

Afin d'inventorier la collection des fonctions auriculaires que possède cette sous-population de cellules endocardiques, ergo de *Tbx5*, des mutants conditionnels *Tie2-Cre;Tbx5<sup>Flox/Flox</sup>* (*eTbx5<sup>Flox/Flox</sup>*) spécifiques aux cellules endothéliales/endocardiques, parmi lesquelles les cellules endocardiques *TBX5<sup>+</sup>*, ont ensuite été générés. L'ablation partielle ou totale de *Tbx5* dans cette sous-population distincte de cellules endocardiques a révélé le rôle essentiel de ce gène dans la genèse du septum inter-auriculaire, puisqu'approximativement 74% des souris *eTbx5<sup>-/-</sup>* exhibent une absence totale de septum inter-auriculaire ou des CIAs de type II, tandis que les 26% de souris résiduelles présentent des CIAs de type I (FOPs) sévères [695]. Hormis le rôle de *Tbx5* dans la septation inter-auriculaire, une étude réalisée en collaboration avec l'équipe de Benoit G. Bruneau a également révélé la nécessité d'un gradient d'expression myocardique antéro-postérieur croissant de *Tbx5* dans le positionnement et la formation du septum inter-ventriculaire chez les archosauriens et les synapsides [499] (voir section " 6.1.2 "). La contribution de *Tbx5* dans la septation cardiaque ainsi que dans l'établissement de la polarité de l'axe dorso-ventral de la rétine [696] fait de ce gène un protagoniste majeur du " patterning " tissulaire, et tout particulièrement du " patterning " des lignées myocardiques et endocardiques. Les mécanismes moléculaires par lesquels les septations inter-auriculaire et inter-ventriculaire

s'effectuent demeuraient toutefois inconnus. L'étude menée pour déterminer le rôle de *Tbx5* dans les cellules endocardiques a ainsi permis d'établir que ce gène était spécifiquement nécessaire à la survie des cellules endocardiques bordant le septum primum. En effet, durant la formation de cette structure cardiaque, seules les cellules endocardiques  $TBX5^+$  bordant le septum primum semblent susceptibles à l'apoptose vers E14,5 proportionnellement au nombre d'allèle *Tbx5* inactivé, et par conséquent du niveau d'expression de ce gène, dans les embryons *eTbx5<sup>+/-</sup>* et *eTbx5<sup>-/-</sup>*. Au contraire, le reste de la sous-population de cellules endocardiques originellement  $TBX5^+$ , présente dans les bourrelets endocardiques AV, ne subit pas davantage d'apoptose chez les souris *eTbx5<sup>+/-</sup>* et *eTbx5<sup>-/-</sup>*, par rapport aux souris témoins *eTbx5<sup>+/+</sup>* [695]. La sous-population de cellules endocardiques originellement  $TBX5^+$  semble donc se diversifier selon les structures qu'elles colonisent. En outre, les cellules endocardiques  $TBX5^+$  bordant le septum primum établissent rapidement une correspondance unilatérale ou réciproque avec les cardiomyocytes structurant le septum, puisque ces derniers sombrent davantage en apoptose proportionnellement à la diminution de la survie des cellules endocardiques *eTbx5<sup>+/-</sup>* et *eTbx5<sup>-/-</sup>* [695]. L'intégrité du septum primum est donc compromise dès E14,5 dans ces mutants conditionnels de délétions, dans lesquels le degré de survie des cellules endocardiques/myocardiques de cette cloison décroît conjointement au niveau d'expression de *Tbx5*. Cette étude démontre une fois de plus que le rôle de " patterning " de *Tbx5* est fortement corrélé aux niveaux d'expression de ce gène [481, 517].

Chez les humains, l'haploinsuffisance d'autres gènes cardiaques tels que *GATA4* [379, 380] et *NKX2.5* [393], provoquée par certaines mutations génétiques, sont également responsables de CIAs. L'haploinsuffisance de *Gata4* [384, 385, 697-699] ou de *Nkx2.5* [390-392] chez la souris entraîne également des malformations cardiaques, confirmant que ces deux facteurs de transcription agissent de manière dose-dépendante dans la morphogenèse de structures du cœur, similairement à *Tbx5*. Les interactions coopératives établies *in vitro* et *in vivo* entre  $TBX5$ , *GATA4* et *NKX2.5*, ainsi que les MCCs communes associées à ces trois gènes attestent de leurs collaborations dans la genèse des structures cardiaques affectées. En outre, certaines mutations humaines interfèrent



directement avec la capacité de ces facteurs de transcription à constituer des complexes multi-protéiques transcriptionnels reconnus pour participer à la cardiogénèse. Notamment, parmi l'ensemble des mutations GATA4 humaines répertoriées, la substitution G296S produit une protéine hypomorphe de GATA4 dont l'affinité de liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle sont réduites, tandis que l'interaction physique avec TBX5 est abolie [379]. L'abrogation de l'interaction combinatoire mutuelle entre TBX5 et GATA4 (G296S) fournit un exemple de mécanisme moléculaire occasionnant certaines des malformations cardiaques.

Au-delà de la coopération fonctionnelle entre les facteurs de transcription, des interactions génétiques interviennent également dans la morphogénèse de structures cardiaques. En l'occurrence, chez les doubles hétérozygotes *eTbx5*<sup>+/-</sup>; *Gata4*<sup>wt/KO</sup>, la mortalité élevée pré- et post-natale ainsi que la hausse de la sévérité des MCCs relativement aux souris *eTbx5*<sup>+/-</sup> ou *Gata4*<sup>WT/KO</sup>, et plus particulièrement l'aggravation des CIAs, supportent la réalité de l'interdépendance génétique et fonctionnelle entre *Tbx5* et *Gata4* dans la genèse du septum inter-auriculaire [695]. L'action conjointe et coopérative de *Gata4* et *Tbx5* a récemment été reconfirmée par l'absence complète de septation auriculo-ventriculaire et un amincissement du myocarde ventriculaire causant le décès de l'ensemble des animaux *Gata4*<sup>+/-</sup>; *Tbx5*<sup>+/-</sup> entre E15,5 et la première semaine suivant la naissance [502]. L'haploinsuffisance composite de *Gata4* et *Tbx5* engendre des MCCs sévères qui sont inexistantes chez les souris monogéniques hétérozygotes. Ces souris *Gata4*<sup>+/-</sup>; *Tbx5*<sup>+/-</sup> prouvent également, qu'au-delà de la formation du septum inter-auriculaire, *Gata4* et *Tbx5* sont conjointement indispensables de manière dose-dépendante à la morphogénèse et la maturation de structures cardiaques plus fondamentales telles que le myocarde ventriculaire ainsi que les valves et le septum auriculo-ventriculaire [502]. L'appartenance de plusieurs gènes, tels que *Tbx5* et *Gata4*, à des RRGs communs est d'ailleurs exploité afin de prédire et de tester l'influence de l'interaction génétique entre certains gènes candidats de ces RRGs sur l'expression d'un phénotype de maladies ou de malformations congénitales [700, 701]. L'interaction fonctionnelle de *Tbx5* et *Gata4* dans certains RRGs responsables de la morphogénèse de structures cardiaques communes indique donc que ces deux gènes peuvent agir comme des gènes modificateurs

mutuels et ainsi influencer la pénétrance et l'expressivité de certaines MCCs humaines, telles que des CIAs, des CIVs, ou des TOFs.

L'interaction génétique de facteurs de transcription, tels que *Tbx5* et *Gata4/6*, dans la cardiogénèse suggère également que la pénétrance et l'expressivité des MCCs d'étiologie monogénique sont sous l'influence d'autres facteurs génétiques (polymorphisme génétique d'autre gène), environnementaux, et/ou stochastiques. Ainsi, les MCCs peuvent être considérés comme des affections polygéniques puisqu'elles font intervenir simultanément de nombreux allèles de plusieurs gènes, chaque gène ayant une influence plus ou moins limitée sur le trait phénotypique final pour un génotype donné. Le seuil de susceptibilité (seuil d'apparition) des MCCs est atteint par l'action conjointe de diverses combinaisons d'allèles de gènes différents et/ou de facteurs environnementaux. La nocivité d'une mutation génétique au niveau du gène *TBX5* chez l'humain peut donc varier en fonction d'autres facteurs génétiques et/ou environnementaux. Des études génétiques de populations commencent d'ailleurs à identifier des polymorphismes génétiques qui sont susceptibles d'exacerber une affection, ergo d'agir comme facteur aggravant d'une maladie. Une étude récente chez la souris corrobore ce phénomène en démontrant l'interdépendance entre les niveaux d'expression de *Brg1* et des facteurs cardiogéniques à l'origine de MCCs, tels que *Tbx5*, *Tbx20*, ou *Nkx2.5*, dans la genèse de ces malformations cardiaques [519]. Par conséquent, chez l'humain, certains polymorphismes des sous-unités BRG1 ou BAFs (*Brg1/Brm*-associated factors) des complexes de remodelage de la chromatine Swi/Snf pourraient moduler la pénétrance et la sévérité des phénotypes cardiaques causés par l'haploinsuffisance d'un des facteurs de transcription à l'origine de ces MCCs. Ainsi, le déséquilibre des interactions moléculaires suscité par certains de ces allèles polymorphes perturberait davantage l'activité de RRGs impliqués dans la morphogénèse et les fonctions cardiaques. La caractérisation des interactions génétiques et fonctionnelles permet de démontrer que l'interdépendance de certains gènes est primordiale dans la pénétrance et l'expressivité des MCCs.

Aux origines multigéniques des MCCs s'ajoutent également des facteurs environnementaux, tels que le stress, le diabète, les facteurs de croissance, la

consommation d'alcool et/ou de cigarettes, qui participent à l'augmentation des risques de malformations congénitales [530, 543-552]. Récemment, une étude a démontré que l'exposition de poissons zèbre à des doses élevées de D-glucose a engendré des MCCs résultant essentiellement de défauts de l'inflexion sigmoïde cardiaque et d'altération de l'expression des gènes cardiogéniques *Tbx5*, *Tbx20* et *Has2* [702]. Ces résultats reflètent les effets drastiques sur la cardiogénèse que peuvent entraîner l'altération d'un unique facteur environnemental. Les facteurs environnementaux constituent donc des stimuli exogènes qui ont indubitablement la capacité de perturber des RRGs en influençant les niveaux d'expression de certains gènes. Tel est le cas de l'allèle polymorphe (G894T) du gène *eNOS* (*NOS3*) qui est associé à des risques accrus de MCCs, et plus particulièrement de malformations conotruncales [549, 703], probablement causé par une diminution des niveaux de NO résultant soit d'une réduction de l'activité enzymatique [704-706] soit d'une susceptibilité accrue au clivage protéolytique de ce variant de *NOS3* [707], bien que cette dernière explication semble avoir été réfutée [708]. *NOS3* établit également un lien entre les interactions gène-environnement et le risque de MCCs étant donné que le génotype 894 TT des mères gestantes fumeuses est associé à un risque accru de MCCs, et plus particulièrement de MCCs ciblant davantage les structures autres que le conotrunc, telles que des CIAs [549]. Il existe donc une influence entre l'environnement foetal, déterminé entre autres par le comportement maternel, et le polymorphisme de certains gènes sur la pénétrance et la sévérité des MCCs. Certains facteurs environnementaux prénataux nocifs peuvent donc exacerber les MCCs. Le modèle murin *Tie2-Cre;Tbx5<sup>del/+</sup>;eNos<sup>+/-</sup>* corrobore l'interaction génétique synergistique entre *Tbx5* et *Nos3* dans la formation du septum inter-auriculaire puisque les souris doubles hétérozygotes pour ces deux gènes exhibent une aggravation des CIAs et une mortalité de 50% entre la naissance et le sevrage [695]. Chez l'humain, *NOS3* est donc susceptible d'agir comme un gène modificateur de *TBX5*, et probablement d'autres gènes cardiaques dont l'haploinsuffisance est génératrice de MCCs. Par conséquent, l'identification de polymorphismes au niveau du gène *NOS3* pouvant influencer l'expressivité des diverses malformations du SHO permettrait sans doute d'expliquer en partie la variabilité phénotypique intra- et inter-familiales des MCCs retrouvés chez les patients atteints du SHO [508, 514].

La pénétrance et l'expressivité des MCCs résultent donc de l'influence de divers facteurs environnementaux et d'une combinaison de multiples loci polymorphiques, chacun d'entre eux contribuant pour seulement une fraction de l'expressivité d'un trait phénotypique. La démonstration d'une interdépendance génétique entre *Tbx5* et *Nos3* témoigne de l'influence des interactions gène-environnement dans l'expressivité d'une MCC. La souris *Tie2-Cre;Tbx5<sup>flox/flox</sup>*, qui ne cible qu'une structure cardiaque unique (le septum inter-auriculaire) parmi les diverses MCCs répertoriées dans le SHO, est donc un modèle murin primordial dans l'évaluation de l'influence d'autres loci et de l'environnement sur l'émergence de CIAs. Finalement, ce modèle murin autorise la dissection des mécanismes moléculaires responsables de la survie des cellules endocardiques/myocardiques indispensables à la genèse du septum inter-auriculaire.

### **6.1.2 Fonctions myocardiques de *Tbx5* dans la genèse du septum inter-ventriculaire**

Hormis son rôle crucial dans la formation du septum inter-auriculaire, *Tbx5* est également indispensable à la morphogenèse de la cloison inter-ventriculaire, comme en témoigne la grande proportion de CIVs musculaires répertoriées chez les patients atteints du SHO [507, 511]. Une étude de génétique des populations récente corrobore également cette fonction inhérente à *TBX5*, puisqu'elle révèle une forte corrélation entre le polymorphisme du gène *TBX5* et l'incidence de CIVs chez l'ethnie Han du peuple chinois [709]. En revanche, une étude réalisée en collaboration avec l'équipe de Benoit G. Bruneau [499] a également démontré la nécessité d'un gradient d'expression myocardique antéro-postérieur croissant de *Tbx5* afin d'assurer le positionnement et la formation du septum inter-ventriculaire chez les archosauriens et les synapsides, dont les mammifères sont les seuls représentants actuels. En effet, contrairement aux amphibiens et aux lépidosauriens (sphénodons, lézards, serpents, iguanes) qui expriment *Tbx5* de manière uniforme dans leur ventricule unique, les archosauriens (crocodiles et oiseaux) et les synapsides (mammifères) expriment *Tbx5* selon un gradient antéro-postérieur croissant. Les anapsides (chéloniens) représentent une forme intermédiaire entre les lépidosauriens et les archosauriens puisqu'un léger gradient

antéro-postérieur croissant s'établit dans le ventricule primitif, et une structure rudimentaire analogue à une ébauche de septum inter-ventriculaire se développe, sans toutefois former une cloison définitive et complète. Cette observation suggère que le gradient d'expression de *Tbx5* s'est raffiné au cours de l'évolution afin de spécifier la formation d'un septum inter-ventriculaire complet, et de définitivement séparer la circulation pulmonaire de la circulation systémique. En effet, la surexpression de *Tbx5* dans les ventricules chez la souris (*Mef2cAHF-Cre;CAT-Tbx5*, *Nkx2.5-Cre;CAT-Tbx5* [499], ou  $\beta$ -MHC-*Tbx5* [480, 497]), afin d'imiter l'expression ventriculaire uniforme de *Tbx5* chez les anapsides et les lépidosauriens, résulte en la formation d'un ventricule unique dépourvu d'IVS. Similairement aux expériences réalisées chez la souris, lorsque la surexpression de *Tbx5* est ubiquitaire dans le ventricule primitif de poulet, aucun IVS ne se développe. Dans les cœurs de poulets au niveau desquels le domaine d'expression de *Tbx5* subit une expansion incomplète, suite à l'électroporation du transgène, l'IVS se déplace vers la droite, ce qui corrobore que la disparité d'expression de *Tbx5* entre les deux ventricules est requis pour initier la formation de l'IVS [497]. En revanche, le maintien de l'identité gauche au niveau des ventricules transgéniques, dépourvus d'IVS, dans lesquels *Tbx5* est surexprimé de façon homogène [480, 497, 499] supporte l'hypothèse selon laquelle un gradient décroissant d'expression de *Tbx5* s'est établi dans le ventricule primitif afin de favoriser le développement d'une cloison, au cours de l'évolution des archosauriens et des synapsides, qui a permis de séparer définitivement la circulation pulmonaire de la circulation systémique. L'érection de ce septum inter-ventriculaire a ainsi autorisé la subdivision du ventricule primordial en un ventricule gauche (ventricule systémique) et un ventricule droit (ventricule pulmonaire). L'évolution graduelle du " patterning " du ventricule droit a progressivement permis l'établissement d'une signature moléculaire distincte de celle du ventricule gauche, ce dernier s'apparentant davantage au ventricule primordial.

Les résultats de la surexpression de *Tbx5* chez le poulet et la souris illustrent donc le rôle décisif du dosage de *Tbx5* dans la morphogenèse du septum inter-ventriculaire, étant donné que le contraste du degré d'expression de *Tbx5* entre les ventricules gauche et droit est nécessaire à l'établissement d'une frontière au

niveau de laquelle l'ébauche de l'IVS initie sa formation. Étonnamment, l'ablation de *Tbx5* au niveau du ventricule droit (*Mef2AHF-Cre;Tbx5<sup>del/del</sup>*) résulte en la formation d'un ventricule unique d'identité gauche dépourvu d'IVS, au lieu de déplacer cette cloison vers la gauche tel que cela était escomptée [499]. Ce résultat démontre que l'expression rigoureuse de *Tbx5* dans le ventricule gauche ne suffit pas à initier la formation de l'IVS, mais, qu'au contraire, la présence d'un gradient d'expression entre les deux ventricules est indispensable. La faible expression de *Tbx5* au niveau des trabécules du ventricule droit est donc nécessaire au positionnement et à la croissance subséquente de l'IVS. Par contre, l'absence d'expression de *Tbx5* au niveau de l'interface entre le ventricule gauche et droit, à l'emplacement exact où les progéniteurs du CCP et du CCS se rencontrent, participe vraisemblablement à l'établissement de la frontière au niveau de laquelle s'initie la formation de l'IVS. Des études de filiation cellulaire confirment effectivement que l'apposition de sous-populations de progéniteurs d'origine oligoclonale dérivées du CCP (paroi gauche de l'IVS) et du CCS (paroi droite de l'IVS) [710], ainsi que la croissance orientée de ces progéniteurs contribuent à la morphogenèse de la cloison inter-ventriculaire [96]. L'importance de la présence d'un domaine *Tbx5* au niveau de l'interface des ventricules gauche et droit dans l'initiation de la formation de l'IVS semble étayée par la formation d'une structure analogue à un IVS au sein même du ventricule droit chez des poulets électroporés par un virus RCAS à réplication-incompétente, porteur d'un transgène EGFP-*Tbx5* [497]. L'infection locale du ventricule droit par ce transgène engendre la formation de cette cloison inter-ventriculaire supplémentaire entre la zone de forte expression ectopique d'EGFP-*Tbx5* et la zone de faible expression endogène de *Tbx5* au sein du ventricule droit.

Des marquages moléculaires suggèrent en effet qu'une région étroite, dotée d'une signature moléculaire distincte des deux ventricules, s'établit relativement tôt durant la cardiogénèse au niveau du futur sulcus inter-ventriculaire. Une étude a d'ailleurs déterminée que *Tbx5* semble initier l'activation d'un RRG à la frontière entre la paroi compacte du ventricule gauche et la région étroite au niveau de laquelle l'IVS se développera. Ce RRG, qui influence le " patterning " du sillon inter-ventriculaire, se caractérise par l'activation d'une boucle d'action directe

secondaire négative (" *negative feed-forward circuit* ") impliquant *Tbx5* et *Sall4*. Dans ce RRG, *Tbx5* active l'expression de *Sall4* au niveau du sillon inter-ventriculaire, qui a son tour inhibe l'activation de certains gènes cibles de *Tbx5*, tels que *Nppa*, afin d'assurer la morphogenèse du septum inter-ventriculaire. A contrario, l'interaction combinatoire entre *Tbx5* et *Sall4* favorise l'activation d'autres gènes, tels que *Gja5* (*Connexin40*). Ainsi, au sein de ce RRG, *Sall4* assiste *Tbx5* à affiner les frontières entre deux champs morphogénétiques cardiaques [498]. Par conséquent, conjointement à la spécification de l'identité du ventricule gauche, *Tbx5* intervient dans le " patterning " du sillon inter-ventriculaire grâce à l'établissement et à la régulation de RRGs divergents au niveau du ventricule gauche et de la région limitrophe à l'IVS.

Le gène *Tbx5* est donc requis au niveau de diverses sous-populations de progéniteurs cardiogènes afin d'assurer la morphogenèse de différentes structures cardiaques. L'expression de *Tbx5* dans une sous-population de cellules endocardiques et mésenchymateuses au niveau du canal AV intervient dans la survie de ces cellules, tandis qu'un facteur paracrine sous le contrôle de *Tbx5* engendre l'établissement d'une communication croisée entre la sous-population de cellules endocardiques *Tbx5*<sup>+</sup> et le myocarde au niveau du septum primum, afin d'assurer la survie des cardiomyocytes, et ultimement de garantir la maturation du septum inter-auriculaire. En outre, le gradient antéro-postérieur croissant de *Tbx5* au niveau du CCP garantit la spécification des oreillettes et du ventricule gauche, ainsi que le " patterning " du sillon inter-ventriculaire au niveau duquel le septum inter-ventriculaire s'érige.

## **6.2 Affinage des fonctions cardiaques de *Tbx5* via l'action subsidiaire d'isoformes alternatifs**

L'avènement du séquençage automatique haut débit autorise depuis quelques années à l'analyse quasiment systématique du transcriptome cellulaire. Ce progrès technologique a permis entre autres de démontrer l'importance de l'épissage alternatif dans l'hétérogénéisation du transcriptome (au-delà de 97% des gènes multi-exoniques génèrent des transcrits alternatifs [711, 712]) et la diversification

fonctionnelle du protéome cellulaire, qui se révèle être essentiel dans le raffinement de la régulation de nombreux processus biologiques durant l'embryogenèse [713] et après la naissance [714]. L'étude approfondie des RRGs se succédant durant la différenciation cellulaire a par exemple mis en évidence de multiples transitions de transcrits alternatifs durant la différenciation des cellules souches embryonnaires en précurseurs cardiaques. Notamment, les cellules souches embryonnaires exhibent un enrichissement en isoformes alternatifs qui opposent l'arrêt du cycle cellulaire tandis que les précurseurs cardiaques expriment davantage d'isoformes qui promeuvent la signalisation calcium-dépendante et le développement cardiaque [715]. Dès lors, des profils spécifiques d'épissage alternatifs sont associés aux diverses étapes de transition d'une cellule pluripotente à une cellule différenciée. En effet, cette même étude démontre que la différenciation cardiaque s'accompagne de l'épissage alternatif de réseaux de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, de la contractilité cardiaque, de l'activité hélicase, de la liaison à la chromatine, de l'épissage alternatif, de la formation de jonctions cellulaires adhérentes, des voies de signalisation Wnt et des serine/thréonine kinases, et de l'inhibition de la neurogenèse. En revanche, fréquemment, l'épissage alternatif ne fait qu'altérer de manière coordonnée le répertoire fonctionnel de certaines protéines d'une même voie de signalisation afin de modifier une ou plusieurs réponse(s) biologique(s), telles que la prolifération, la croissance, l'apoptose, ou la spécification cellulaire [715]. De surcoût, nombre de ces événements d'épissage alternatif modifient la composition en motifs/domaines protéiques et/ou incluent ou éliminent des éléments de liaison aux microARNs, suggérant que l'épissage alternatif affecte à la fois la fonction et l'expression protéique [715, 716].

Dans le cœur, seules quelques études ont démontré le rôle crucial de l'épissage alternatif dans l'ontogenèse et les fonctions cardiaques. Par exemple, une transition dans l'expression d'isoformes, générés par épissage alternatif, semble coïncider avec l'activation des RRGs associés à la phase de remodelage cardiaque physiologique post-natal [714, 717]. La fluctuation dans le type d'isoformes alternatifs, spécifiques à certains gènes cardiaques, est indispensable à l'adaptation du cœur aux demandes physiologiques extra-utérines. En revanche,



plusieurs régulateurs d'épissage de l'ARN pré-messager contribuent aux variations d'expression d'isoformes de gènes cardiaques durant les différentes étapes de l'ontogenèse du cœur. L'ablation ventriculaire des régulateurs d'épissage *Sc35* [718] ou *Asf/Sf2* [717] via *Mlc-2v-Cre* ne semble pas occasionner d'altérations durant la cardiogénèse, mais entraîne chez les souris homozygotes une cardiomyopathie dilatée quelques semaines après leur naissance, causée par la compromission sévère de la fonction cardiaque de couplage excitation-contraction qui normalement s'intensifie durant l'accroissement de la charge de travail chez les souris juvéniles évoluant vers l'âge adulte. Seule la délétion d'*Asf/Sf2* conduit au décès des souris homozygotes approximativement 7 semaines après leur naissance [717], suggérant donc que *Sc35* et *Asf/Sf2* régulent l'épissage alternatif de différents gènes cardiaques et contrôlent des fonctions distinctes durant l'étape de remodelage du cœur survenant pendant la transition juvénile-adulte. L'épissage alternatif est également crucial durant la cardiogénèse étant donné que l'ablation homozygote du régulateur d'épissage alternatif *SRp38* engendre de multiples malformations cardiaques (CIA, CIV, anomalies du septum auriculo-ventriculaire) entraînant le décès des fœtus vers E15,5 [719].

Malgré l'étendue des gènes cardiaques régulés post-transcriptionnellement durant la cardiogénèse, l'épissage alternatif des gènes codant pour les facteurs de transcription cardiogéniques demeure faiblement étudié. Parmi ces facteurs de transcription, les isoformes alternatifs courts de *Srf*, qui se caractérisent par des troncations variables du domaine d'activation transcriptionnelle au niveau de la région C-terminale, agissent essentiellement comme des dominants négatifs de la forme complète constitutive de SRF afin d'inhiber la fonction transactivatrice de ce dernier une fois que les cellules musculaires sont totalement différenciées [720]. La différenciation des cellules mésenchymateuses viscérales en cellules musculaires lisses est par exemple favorisée par une proportion plus élevée de l'isoforme complet de *Srf* vis-à-vis des isoformes tronqués [721]. Durant l'insuffisance cardiaque, la répression de l'expression de gènes *Srf*-dépendant codant entre autres pour des protéines sarcomériques est assurée par l'élévation significative de l'expression d'un des isoformes tronqués de *Srf* [722]. L'équilibre délicat entre les différents isoformes alternatifs de *Srf* permet une régulation

précise des divers gènes cibles de *Srf* ainsi que l'auto-régulation du gène *Srf* durant la croissance et la différenciation musculaire de divers tissus [723]. À l'instar de *Srf*, l'activité répressive du co-facteur FOG-2 dans le cœur semble être modulée par la génération d'un isoforme alternatif FOG-2S également capable d'interagir physiquement avec GATA4, mais dont le domaine de répression est absent [724]. En outre, la sortie du cycle cellulaire des cardiomyocytes durant la cardiogénèse est régulée par un transcrit alternatif de la *Cyclin D2* qui assure l'agrégation et la séquestration d'autres régulateurs du cycle cellulaire au niveau des compartiments golgiens, lysosomaux et du réticulum endoplasmique [725]. Durant l'ontogénèse cardiaque, d'autres facteurs de transcription sont également soumis à l'épissage alternatif tels que *Myocardin* [726], et *Microphthalmia (Mitf)* [727, 728].

Parmi l'ensemble des transcrits alternatifs des gènes à boîte T (T-box) répertoriés dans les bases de données publiques, seuls une minorité ont été étudiés au niveau des gènes *Tbx3* [452, 729, 730], *Tbx20* [474], et *Tbx22* [731]. Bien que les fonctions biologiques spécifiques de ces isoformes alternatifs ne soient pas précisément définies pour ces trois gènes T-box, des divergences fonctionnelles sont observables. Parmi les facteurs à T-box cardiaques, *Tbx3* possède plusieurs isoformes [452] dont deux seulement ont été étudiés, l'isoforme constitutif *Tbx3* et l'isoforme alternatif *Tbx3* + Exon 2a qui se caractérise par une insertion de 20 acides aminés dans le domaine à boîte T de liaison à l'ADN [729, 730]. Des résultats contradictoires quant aux propriétés anti-sénescence de ces deux isoformes ont été obtenus, une étude indiquant que *Tbx3* + exon 2a est un répresseur de la sénescence [732], tandis que l'autre étude démontre que les deux isoformes ont des propriétés opposées, l'isoforme *Tbx3* se comportant comme un suppresseur de la sénescence pendant que l'isoforme *Tbx3* + 2a accélérerait la sénescence résultant en un arrêt du cycle cellulaire [729]. Malgré ces résultats contraires, les fonctions cardiaques de ces deux isoformes semblent similaires vis-à-vis de la répression de l'expression des marqueurs myocardiques (*Nppa* et *Connexine 40*) et de l'inhibition de la différenciation du myocarde contractile [730]. Dans le cas de *Tbx20*, au moins 4 isoformes sont synthétisés par épissage alternatif durant la cardiogénèse. Parmi ces 4 isoformes, seul l'isoforme long

constitutif (*Tbx20a*) possède les domaines transcriptionnels fonctionnels de la région C-terminale et détient la capacité de moduler les processus morphogénétiques ainsi que l'expression génique, étant donné que l'expression forcée de *Tbx20a*, contrairement aux autres isoformes alternatifs, dans les embryons de Xénope stimule la migration cellulaire et induit l'expression ectopique de marqueurs du mésoderme latéral et de l'endoderme [474].

À l'instar de beaucoup d'autres gènes cardiaques [715], l'étude que nous avons menée sur la régulation post-transcriptionnelle de *Tbx5* a révélé que les fonctions de ce gène sont modulées durant l'ontogenèse du cœur par l'ajustement des proportions d'isoformes (*Tbx5\_v1* = *Tbx5a* et *Tbx5\_v2* = *Tbx5b*) (Fig. 5.1) synthétisés par épissage alternatif [687]. Les niveaux plus élevés de l'isoforme *Tbx5\_v1* avant E13,5 et juste après la naissance suggère un rôle de cet isoforme dans le " patterning " des différentes lignées cardiaques *TBX5*<sup>+</sup> [497, 499, 695] et la croissance des cardiomyocytes, à défaut d'influencer la prolifération cellulaire dans le CCP après E8,5 étant donné le rôle probablement anti-prolifératif de *Tbx5\_v1* suite à la différenciation des cardiomyocytes, tel que relaté dans la littérature [493]. Toutefois, l'expression précoce de *Tbx5* dans les progéniteurs cardiogènes dès E7,25 n'exclut pas une fonction proliférative de *Tbx5* dans les stades précoces de la cardiogénèse, étant donné que ce gène T-box est impliqué dans la prolifération cellulaire cardiaque chez le Xénope en favorisant la progression de la transition G<sub>1</sub>/S du cycle cellulaire [492]. A contrario, la prédominance de *Tbx5\_v2* après E13,5 et dans le cœur adulte favoriserait l'arrêt de la croissance cardiomyocytaire. Il est donc entièrement concevable que les mutations de *TBX5* entraînant une troncation de la région C-terminale accroissent la concentration d'une protéine mutée qui, à l'instar de *Tbx5\_v2*, interfère avec la croissance de certaines structures cardiaques. En outre, l'absence de compétition pour la liaison aux sites TBEs sur des gènes cibles de *Tbx5*, et la présence de ces deux isoformes dans des complexes multi-protéiques chromatinien totalement distincts confirment que *TBX5\_V2* n'agit pas comme un dominant négatif de *TBX5\_V1*, d'autant plus que *TBX5\_V2* n'inhibe pas l'activité transactivatrice de *TBX5\_V1* sur le promoteur de *Nppa* dans les cardiomyocytes. De surcroît, la capacité de *TBX5\_V2* à intégrer des complexes multi-protéiques chromatinien de

très hauts poids moléculaires, uniquement dans les cœurs de souris adultes, et d'interagir encore modérément avec certains cofacteurs de TBX5\_V1, tels que GATA4 (à l'opposé de NKX2.5), suggère que l'isoforme TBX5\_V2 possède des fonctions cellulaires qui lui sont propres et totalement distinctes de celles de TBX5\_V1 [687]. L'interaction de la région C-terminale de *Tbx5* avec TAZ [733] supporte également que des partenaires protéiques divergent entre les différents isoformes alternatifs de *Tbx5*. Des variations de fonctions entre les isoformes alternatifs de gène T-box ont également été récemment suggérées pour *Tbx20*, puisque seul l'isoforme TBX20b possède la capacité de lier MKLN1 et de co-localiser avec cette protéine au niveau du cytoplasme du mésenchyme de valves auriculo-ventriculaires et des cardiomyocytes du septum inter-ventriculaire [734].

Hormis les isoformes *Tbx5\_v1* et *Tbx5\_v2*, d'autres isoformes alternatifs semblaient exister étant donné la présence dans les extraits cardiaques de protéines immuno-réactives à l'anticorps TBX5, et dont le poids moléculaire fluctuait entre ceux de TBX5\_V1 et TBX5\_V2 [687]. De multiples analyses PCR effectuées sur des ADNc d'embryons et de cœurs nous ont permis de mettre en évidence au moins 4 autres isoformes alternatifs dont un code pour une protéine tronquée en N-terminale (*Tbx5\_v5*) et deux autres codent pour des protéines tronquées en C-terminale (*Tbx5\_v3* et *Tbx5\_v4*), tandis que le quatrième isoforme (*Tbx5\_v6*) synthétise la même protéine que l'isoforme long TBX5\_V1 de 518 aa, mais se caractérise par une région 3'UTR plus courte générée par la sélection d'un site de polyadénylation alternatif (Fig. 5.1). La variation en longueur des régions 3'UTR des transcrits *Tbx5\_v1* et *Tbx5\_v6* pourrait être impliqué dans le contrôle de la stabilité, la localisation, et/ou la traduction de l'ARNm [712]. L'isoforme alternatif *Tbx5\_v5* dénué de la région N-terminale découle de l'épissage de l'exon 1b et 3. Les deux isoformes tronqués en C-terminal après le résidu 327 de TBX5a résultent soit d'une extension de l'exon 9 dans la région intronique (*Tbx5\_v3*), soit de l'épissage alternatif de l'exon 9 avec l'exon 10 (*Tbx5\_v4*). En revanche, ces deux isoformes de tailles relativement similaires (376 aa pour TBX5\_V3 et 404 aa pour TBX5\_V4) se caractérisent par une extension peptidique après le résidu 327 de TBX5\_V1. La divergence élevée entre les séquences humaines et murines des extensions peptidiques de chacun des deux isoformes alternatifs, ainsi que

l'absence de domaines fonctionnels connus suggèrent que ces régions peptidiques n'ont pas subi de sélection négative (pression de sélection) durant l'évolution. L'absence de caractéristiques fonctionnelles au niveau de ces extensions peptidiques laisse supposer que ces deux isoformes alternatifs ne sont que deux formes tronquées aux fonctions relativement similaires, qui ne conservent qu'un des deux domaines de transactivation de TBX5\_V1. À l'instar de TBX5\_V2, ces deux isoformes alternatifs ne devraient pas se comporter comme des dominants négatifs de TBX5\_V1. D'ailleurs, le mutant récessif "heartstrings" chez le poisson zèbre, caractérisé par une troncation de TBX5 au résidu 316, n'agissait clairement pas comme un dominant négatif, mais plutôt comme une protéine mutante dont les fonctions cellulaires spécifiques de la forme longue TBX5\_V1 étaient altérées, ce qui provoquait une haploinsuffisance fonctionnelle de TBX5\_V1 [735].

Étonnamment, en plus de son activité transcriptionnelle, *Tbx5* est lui-même impliqué dans la fonction d'épissage constitutif et alternatif des ARNs pré-messagers, de manière coordonnée avec le régulateur d'épissage *Sc35*. Cette fonction dose-dépendante de la régulation de l'épissage alternatif intervient également dans la pathogenèse du SHO étant donné que certaines mutations humaines de *TBX5*, telles que G80R, affectent grandement cette activité, tandis que d'autres mutations, telles que Q49K, I54T, G169R, R237Q, R237W, et S252I, n'altèrent aucunement cette fonction d'épissage [736]. La fonction d'épissage alternatif est également susceptible d'expliquer en partie les différences de pénétrance et d'expressivité des phénotypes cardiaques dans le SHO. En effet, la mutation G80R a une pénétrance cardiaque de 100% contre 54% pour les mutations R237Q/R237W de *TBX5* [508] alors que les fonctions de liaison et d'activation transcriptionnelle sont toutes deux réduites pour ces mutants [737], ne laissant que les divergences de fonctions d'épissage entre ces mutants pour expliquer ces différences de pénétrance. *TBX5* est ainsi le premier gène cardiaque impliqué dans une maladie humaine qui détient à la fois la capacité de réguler la transcription et l'épissage alternatif. Tous les isoformes alternatifs de *Tbx5*, à l'exception potentielle de *Tbx5\_v2* (1-255 aa), sont susceptibles de partager la fonction d'épissage constitutif, étant donné que la protéine recombinante TBX5 tronquée en C-terminale (1-278 aa) préserve intégralement l'activité d'épissage

constitutif d'ARN pré-messagers, dont celui de *Nppa*. L'antagonisme entre *Tbx5* et *Sc35* au niveau de l'épissage constitutif des ARN pré-messagers disparaît lorsque la région C-terminale de *Tbx5* est éliminée [736], ce qui suggère que les isoformes TBX5 tronqués au niveau du domaine C-terminal sont susceptibles de contrôler l'épissage constitutif d'ARN pré-messagers indépendamment de SC35. En revanche, l'épissage alternatif d'ARN pré-messagers, et plus particulièrement la sélection des sites d'épissage, varie selon les proportions de TBX5 et SC35, suggérant une coordination entre TBX5 et SC35 afin de réguler l'épissage alternatif [736]. Dès lors, diverses sous-populations d'ARN pré-messagers ciblés peuvent être régulées par les différents isoformes alternatifs de *Tbx5* selon leur niveau d'expression dans les différentes lignées cardiaques. Il peut être également envisagé que *Tbx5* régule son propre épissage afin de contrôler les proportions de ses différents isoformes.

L'identification de nouveaux isoformes de *Tbx5* aux fonctions divergentes est cruciale car cela suggère que les mutations affectant davantage un isoforme pourraient favoriser l'émergence d'un type particulier de MCC chez les patients atteints du SHO. Le criblage de mutations potentielles au niveau du gène *TBX5* chez des individus affectés par le SHO devra désormais tenir compte des nouveaux exons identifiés au sein du locus de *Tbx5*. En effet, une étude récente relate d'une famille dont deux membres sont atteints du SHO, tandis qu'un troisième semble juste être un porteur sain (aucune malformation observée) [738]. Malgré le phénotype clair correspondant au SHO, aucune mutation n'a été détectée au niveau des exons présents dans les bases de données génomiques publiques. Il est donc tout à fait concevable qu'une mutation affecte un des nouveaux exons 9b (extension 3' de l'exon 9a) ou 10 décrits dans nos travaux. D'autres individus atteints du SHO exhibent en effet des délétions du dernier intron et du dernier exon [739]. Le séquençage des exons alternatifs chez les patients atteints du SHO ne présentant jusqu'à maintenant aucune mutation des exons connus du gène *TBX5* [512] permettra donc probablement d'étendre le taux de détection des mutations *TBX5*. En revanche, deux études de génétique des populations ont également identifié deux SNPs (rs7312625 et rs3825214) avoisinant le nouvel exon 10, associés à une prolongation de l'intervalle PR dans

deux populations humaines [520, 521]. L'un (rs3825214) de ces deux SNPs est également significativement associé dans une population islandaise avec une prolongation des intervalles PR et QT, un allongement de la durée du complexe QRS, un risque accru de bloc auriculo-ventriculaire avancé (2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> degré), ainsi qu'un risque diminué de fibrillation auriculaire [520]. Le risque accru de blocs auriculo-ventriculaires concorde avec les troubles de conduction cardiaque auriculo-ventriculaire observés chez les patients atteints du SHO. Cette découverte suggère donc que certaines variations génétiques pourraient affecter spécifiquement un isoforme et altérer l'épissage alternatif de *TBX5*.

Au-delà de la sensibilité, proportionnelle aux niveaux d'expression de *TBX5*, de la morphogenèse des structures cardiaques perturbées dans le SHO, les fonctions de ce gène semblent en sus scindées parmi les différents isoformes alternatifs. Ce niveau de régulation additionnel fournit un indice supplémentaire quant à l'importance de la régulation post-transcriptionnelle complexe et rigoureuse de ce gène, qui se répercute certainement sur la pénétrance et l'expressivité du large spectre de défauts cardiaques et extra-cardiaques répertoriés parmi les patients humains atteints du SHO. L'identification de SNPs, associés à une prolongation de l'intervalle PR chez les humains, adjacent au nouvel exon 10 suggère en effet que certaines variations génétiques pourraient affecter spécifiquement un isoforme et altérant l'épissage alternatif de *TBX5*.

### **6.3 *Tbx5* dans la régionalisation transcriptionnelle du tandem génique *Nppb/Nppa***

Les hormones cardiaques *Nppa* et *Nppb* opèrent au sein d'une myriade de RRGs impliqués dans l'homéostasie du cœur durant son développement ainsi que diverses conditions physiologiques et physiopathologiques. Cette pléthore de fonctions a incité depuis trois décennies à de multiples investigations portant sur la régulation transcriptionnelle de ces deux gènes lors de la cardiogénèse et durant diverses cardiopathies menant à l'hypertrophie cardiaque pathologique. Parmi ces études, nombreuses ont entrepris, avec un succès mitigé, d'identifier les éléments *cis*-régulateurs camouflés au cœur du locus *Nppb/Nppa*. L'approche bio-

informatique d'empreinte phylogénétique nous a permis de prédire chez les euthériens (mammifères placentaires) l'existence de trois MCRs (US2, US3, et US4), ou enhancers, dissimulés en amont du tandem génique *Nppb/Nppa*. Étonnamment, seuls US2 et US4 semblent conservés chez les métathériens (marsupiaux) et les oiseaux, tandis qu'aucun de ces trois MCRs n'est retrouvé chez les autres vertébrés (poissons et amphibiens) [689]. Ces divergences inter-classes reflètent l'évolution de la régulation transcriptionnelle du tandem génique *Nppb/Nppa* conjointement à l'évolution structurale des chambres cardiaques.

Chez les mammifères, la régulation asymétrique gauche/droite ventriculaire du tandem génique *Nppb/Nppa* semble coordonnée durant la cardiogénèse grâce à cet assortiment de trois MCRs aux fonctions transcriptionnelles hétérogènes. Parmi ces MCRs, le module US3, uniquement retrouvé chez les euthériens, possède une activité transcriptionnelle plus robuste dans le ventricule gauche que dans le ventricule droit à E12,5, identique au profil d'expression ventriculaire de *Nppb/Nppa* et de *Tbx5* durant la cardiogénèse chez la souris. Le recrutement *in vivo* de TBX5 au niveau du module US3 supporte l'hypothèse selon laquelle *Tbx5* est un protagoniste majeur chez les mammifères de la régulation ventriculaire de *Nppb/Nppa* selon un gradient gauche/droit. En effet, US3 ainsi que *Tbx5* et *Nppb/Nppa* exhibent une intense expression dans le ventricule gauche avec un gradient transmural croissant de la zone compacte aux trabécules myocardiques, et une expression plus restreinte exclusivement trabéculaire dans le ventricule droit. La régulation transcriptionnelle du tandem génique *Nppb/Nppa* par TBX5 est supportée par l'absence totale d'expression de *Nppa* dans le cœur des embryons murins *Ella-Cre;Tbx5<sup>del/del</sup>* [481]. Bien que l'expression ventriculaire précoce de *Nppa* nécessite la présence de TBX5, une autre étude réalisée en collaboration avec Koshiba-Takeuchi *et al.* [499] semble suggérer que TBX5 est suffisant mais non indispensable à l'expression de *Nppb/Nppa* dans le ventricule droit. Dans cette étude [499], l'expression de *Nppa* subsiste dans le ventricule droit à E10,5 malgré l'absence de *Tbx5* dans cette chambre cardiaque chez les embryons *Mef2cAHF-Cre;Tbx5<sup>del/del</sup>*, suggérant que *Tbx5* n'est pas nécessaire dans le ventricule droit à des stades plus tardifs. Au contraire, l'expression de *Tbx5* ainsi que *Nppa* s'étendent de manière ectopique dans le ventricule droit à E10,25 chez les



embryons *Mef2cAHF-Cre;CAT-Tbx5* [499], suggérant que des niveaux élevés d'expression de *Tbx5* sont suffisants pour stimuler l'expression de *Nppa* dans le ventricule droit même à des stades embryonnaires plus avancés.

Malgré la convergence évolutive (homoplasie) du “ patterning ” ventriculaire chez les mammifères et les archosauriens (crocodiles et oiseaux) qui a débouchée sur une septation ventriculaire complète [499], certains RRGs ont subi des adaptations divergentes. En effet, parallèlement à l'évolution convergente de la septation ventriculaire, des éléments *cis*-régulateurs différents semblent avoir été sélectionnés entre les mammifères et les archosauriens bien qu'ils assurent une régulation transcriptionnelle ventriculaire relativement similaire des tandems de gènes natriurétiques [689]. En fait, malgré la relative similarité du profil d'expression de *Nppb* entre les mammifères et les oiseaux, le locus des gènes natriurétiques a énormément divergé entre ces deux classes de vertébrés, puisque les oiseaux ont retenu 3 gènes natriurétiques *Cnp-3/Rnp/Nppb* tandis que les mammifères ont seulement conservé le tandem *Nppb/Nppa* [740]. En réalité, seul *Nppb* ainsi que US2 et US4 (en amont du tandem génique *Cnp-3/Rnp/Nppb*) ont été conservé au cours de l'évolution des oiseaux relativement aux mammifères. L'absence du module US3 ainsi que la faible identité d'US2 et d'US4 chez les espèces aviaires suggèrent que les trois MCRs identifiés ont été positivement sélectionnés dans la classe des synapsides, dont les seuls représentants actuels sont les mammifères. Au contraire, l'infra-classe des archosauriens appartenant aux sauropsides, seule autre classe du clade des amniotes regroupant les oiseaux et tous les reptiles actuels, semble seulement posséder US2 et US4. L'absence de génome de chéloniens (anapsides) et l'unique génome incomplet (Anole vert (*Anolis carolinensis*)) de l'infra-classe des lépidosauriens dans les navigateurs publiques de génomes, tels que UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) et Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), a entravé toute vérification de la présence de ces deux MCRs dans les lignées autres que les archosauriens.

Certes, le locus aviaire *Cnp-3/Rnp/Nppb* comprend des séquences analogues à US2 et US4, mais ces éléments divergent considérablement de ceux des mammifères puisqu'aucun motif de liaison aux facteurs de transcription n'est

conservé dans US4 et seuls 10 contre 51 motifs sont conservés dans US2 entre les mammifères et les oiseaux [689]. Parmi les sauropsides, il faut toutefois préciser que la sous-classe des chéloniens (anapsides), qui regroupent les tortues, sont les seuls ayant conservé le tandem génique *Nppb/Nppa* à l'instar des synapsides actuels (mammifères). Tel que mentionné auparavant, l'absence de séquences génomiques, même partielles, d'un chélonien dans les bases de données publiques des navigateurs de génomes empêche toute confirmation de la présence des MCRs euthériens. Il serait en effet intrigant de vérifier si ces trois MCRs mammaliens sont véritablement absents chez les chéloniens, ou très divergents comme US2 et US4 chez des oiseaux, afin de corroborer que ces éléments n'ont été que positivement sélectionné chez les synapsides actuels à l'inverse de toutes autres sous-classe de sauropsides. La conservation du module US3 chez les chéloniens est très improbable étant donné l'absence de ce module chez les oiseaux et surtout chez les métathériens. Par contre, comme les oiseaux, les chéloniens possèdent vraisemblablement des séquences génomiques chevauchant les modules US2 et US4. Selon leur niveau de conservation avec les MCRs euthériens, la présence chez les chéloniens de ces deux enhancers pourrait expliquer le gradient d'expression ventriculaire gauche-droit de *Nppa* observé chez les tortues [499], puisque US2 et US4 régulent exclusivement la transcription dans le ventricule gauche chez les mammifères [689]. Finalement, outre la faible conservation de séquence des module US2 et US4, les profils d'expression des trois gènes natriurétiques aviaires sont également très divergents [740, 741], suggérant que ces gènes sont régulés individuellement sans partager d'éléments *cis*-régulateurs. Les divergences d'expression de *Cnp-3/Rnp/Nppb* et la perte du gène *Nppa* chez les oiseaux [740-742] supportent donc l'hypothèse que *Nppb* est transcriptionnellement contrôlé par un ou plusieurs éléments *cis*-régulateurs aviaires qui diffèrent de ceux des mammifères.

Chez le poulet, *Nppb* [127] et *Tbx5* [743] sont tous deux exprimés dans les deux ventricules aux stades précoces de la cardiogénèse, toutefois *Nppb* reste fortement exprimé dans les deux ventricules [127] tandis que l'expression de *Tbx5* disparaît graduellement du ventricule droit dès le stade HH20 (~E11,25 chez la souris) pour ne subsister que dans le ventricule gauche à partir du stade HH25

(~E13,0 chez la souris) [497, 693, 743, 744]. Ainsi, l'expression ventriculaire précoce de *Nppb* pourrait être sous l'influence de TBX5; par contre, à partir du stade HH25, l'expression de *Nppb* dans le ventricule droit bascule probablement sous le contrôle d'un élément *cis*-régulateur spécifique aux oiseaux et indépendant de *Tbx5* puisque ce facteur de transcription y est absent. Il serait tentant de conjecturer que cet élément *cis*-régulateur soit régulé par le facteur T-box spécifique au ventricule droit chez le poulet, *Tbx20*, toutefois l'expression de ce dernier se limite à la zone compacte de ce ventricule [497] tandis que l'expression de *Nppb* se situe exclusivement au niveau des trabécules [127]. Quoique *Nppb* soit déjà exprimé dans le ventricule droit, l'expression ectopique de *Tbx5* dans cette chambre cardiaque induit davantage l'expression de *Nppb*, suggérant que *Tbx5* est suffisant mais non indispensable à la régulation transcriptionnelle de *Nppb* dans le ventricule droit, similairement à la souris. Hormis la divergence d'expression dans le ventricule droit, *Nppb* est également exprimé au niveau du pôle afférent du cœur chez le poulet par opposition à la souris, ce qui suggère qu'une ou plusieurs séquences *cis*-régulatrices autre qu'US3 sont présentes au sein du locus *Cnp-3/Rnp/Nppb* des oiseaux pour contrôler *Nppb* dans le ventricule droit et le pôle afférent du cœur. L'absence d'un module US3 aviaire corrobore que la régulation transcriptionnelle de *Nppb* diffère entre les mammifères et les oiseaux.

L'approche bio-informatique d'empreinte phylogénétique a également mis en évidence l'existence d'autres motifs au sein du module US3, spécifique aux euthériens, susceptibles de contrôler l'expression de *Nppb/Nppa* dans le ventricule droit. La présence de 3 motifs E-box au cœur du module US3, deux spécifiques aux facteurs *MycMax* et notamment un motif spécifique à *Hand2*, suggère que le facteur bHLH *Hand2* (*dHand*) serait susceptible, en conjonction avec d'autres co-facteurs, de contrôler l'expression de *Nppb/Nppa* dans le ventricule droit. Chez la souris, *Hand2* est effectivement exprimé dans le ventricule droit dès sa morphogenèse, tandis que *Hand1* (*eHand*) est exclusif au ventricule gauche [123, 745]. En revanche, un indice majeur supportant l'hypothèse de la régulation de *Nppb/Nppa* dans le ventricule droit par *Hand2* via le module US3 est que l'expression ventriculaire des marqueurs trabéculaires (*Nppa*, *Nppb*, et la

*Connexine 40*) est augmentée dans les embryons de souris transgéniques ( $\beta$ MHC-*Hand2*) surexprimant ectopiquement *Hand2* dans les deux ventricules, tandis que les profils d'expression de ces gènes demeurent normaux dans les embryons transgéniques ( $\beta$ MHC-*Hand2*- $\Delta$ H<sub>1</sub>LH) sur-exprimant une forme mutée, transcriptionnellement inactive, de *Hand2* [746]. Au contraire, l'expression uniforme de *Hand1* et *Hand2* dans les deux ventricules chez le poulet [497, 747] pourrait expliquer que le module US3, tel qu'il existe chez les euthériens avec la présence de motifs E-box, ne soit jamais apparu chez les archosauriens, à condition que le profil d'expression de *Nppb* concorde avec le gradient gauche/droit observé chez la souris, le rat et l'humain. Par contre, si *Nppb* est uniformément exprimé dans les deux ventricules chez le poulet, tel qu'établi par une étude ayant analysée avec précision le profil d'expression de ce gène [127], la possibilité d'une régulation ventriculaire de *Nppb* chez les archosauriens impliquant au moins une séquence *cis*-régulatrice sous le contrôle de *Hand2* est envisageable, puisque ce dernier y est également exprimé de façon uniforme dans les deux ventricules. Finalement, quel que soit le profil d'expression de *Nppb* chez les oiseaux, la diversité de composition des enhancers mammaliens spécifiques au ventricule droit au niveau d'autres gènes (tels que *Nkx2.5* [748, 749], *Hand2* [750], *Mlc2v* [751], ou la *Dystrophine* [752]), et la démonstration qu'une convergence évolutive du "patterning" ventriculaire [499] a pu s'établir via des RRGs partiellement divergents démontrent que des éléments *cis*-régulateurs totalement disparates peuvent avoir été sélectionnés au cours de l'évolution des archosauriens et des mammifères afin de réguler le tandem génique *Nppb/Nppa*.

Hormis la divergence avec les archosauriens, les MCRs mammaliens du tandem génique *Nppb/Nppa* ont également subi des adaptations durant leur évolution, et plus précisément durant l'évolution des euthériens (mammifères placentaires). En effet, le module US3 semble inexistant chez les marsupiaux puisqu'il est absent chez l'opossum (*Monodelphis domestica*), unique représentant des métathériens présent dans les bases de données publiques de génomes. Bien que les modules US2 et US4 aient légèrement divergés entre les métathériens et les euthériens, la plupart des motifs de liaison à l'ADN de facteurs de transcription sont conservés. Par contre, l'absence du module US3 chez les métathériens et fort

probablement chez les protothériens, dont l'ornithorynque (*Ornithorhynchus anatinus*) est le seul représentant existant dans les bases de données génomiques mais dont la séquence génomique parcellaire empêche toute vérification de l'existence des enhancers, suggère que ce MCR est une adaptation spécifique aux euthériens. Au delà des fonctions régulatrices du module US3 sur le tandem *Nppb/Nppa* pendant la cardiogénèse, cet enhancer pourrait avoir évolué conjointement aux modifications du système cardiovasculaire nécessaires au mode de gestation intra-utérine intégrale spécifique aux mammifères placentaires, afin de ré-induire les gènes natriurétiques *Nppb/Nppa* durant des circonstances délétères inévitables de maintes grossesses. L'ajustement de certains RRGs cardio-vasculaires au cours de l'évolution des euthériens a fort probablement amélioré les capacités d'adaptation du système cardio-vasculaire aux risques de santé et aux sollicitations énergétiques accrues du mode de gestation intra-utérine des mammifères placentaires. Outre l'hypertrophie physiologique du cœur, indispensable à la gestation intra-utérine chez les mammifères, les risques accrus d'évènements d'hypertrophie pathologique associés à la grossesse requièrent une plus grande malléabilité du système de régulation transcriptionnelle des gènes natriurétiques. La présence au sein du module US3 de motifs de liaison à l'ADN de facteurs de transcription participant à l'hypertrophie physio-pathologique supporte cette hypothèse. En effet, le module US3 détient des motifs *MycMax* qui sont susceptibles de réguler la ré-expression de *Nppb/Nppa* durant la grossesse chez des femmes enceintes manifestant des évènements transitoires ou chroniques d'hypertrophies cardiaques pathologiques suite à des stress pathologiques (problèmes de santé) telles que l'hypertension artérielle (ex : pré-éclampsie), l'hypertension pulmonaire... En effet, *c-Myc*, qui n'est pas exprimé dans le myocarde adulte, est rapidement induit dans le myocarde en réponse de quasiment toutes les formes de stress pathologiques, afin de réguler la biogenèse mitochondriale et le métabolisme cardiaque durant l'hypertrophie pathologique [753]. Hormis les fonctions de régulation transcriptionnelles putatives durant des états cardiaques pathologiques au cours de la grossesse chez les euthériens, le module US3 ainsi que US2 et US4 pourraient également intervenir dans la ré-expression de *Nppb* et/ou *Nppa* pendant divers types d'hypertrophie cardiaque pathologique.

L'arrangement des trois MCRs a également varié au cours de l'évolution des euthériens étant donné que la séquence non-codante séparant US3 et US4, présente dans le locus *Nppb/Nppa* chez les rongeurs, est inexistante chez les primates. En réalité, les primates semblent être le seul ordre au sein de l'infra-classe des euthériens à posséder un MCR composite US3-US4 constitué de la fusion des modules US3 et US4. Bien que sa fonction régulatrice reste à tester *in vivo*, il est possible de supposer que cet enhancer composite ait émergé afin de contrôler l'ensemble des fonctions transcriptionnelles des modules US3 et/ou US4. En effet, la réunion d'enhancers hétérogènes résulte en la formation d'un enhancer composite dont l'activité *cis*-régulatrice coïncide généralement avec l'addition des fonctions *cis*-régulatrices de chaque enhancer indépendant, témoignant ainsi de l'autonomie et l'indépendance fonctionnelle de ces unités modulaires que sont les enhancers [754]. Le MCR composite US3-US4, dont la séquence nucléotidique de chacun des modules (US3 et US4) diverge modérément entre l'humain et la souris, a pu évoluer pour d'une part contrôler un sous-ensemble des fonctions transcriptionnelles des modules US3 et/ou US4, ou d'autre part acquérir de nouvelles fonctions transcriptionnelles conférées par des interactions combinatoires de facteurs de transcription dont les motifs de liaison sont désormais adjacents suite à l'unification des modules US3 et US4. Des altérations du profil d'expression spatio-temporelle [755] ou de l'intensité transcriptionnelle [756, 757] peuvent en effet émerger suite à des variations, même minimales, de la séquence nucléotidique d'un enhancer. En outre, en dehors des fonctions régulatrices distinctes de ces enhancers, la redondance transcriptionnelle au niveau du ventricule gauche du module US2 et probablement du module composite US3-US4 chez les primates pourrait demeurer, à l'instar des enhancers US2, US3, et US4 chez les autres euthériens, un avantage majeur pour atteindre un taux de transcription approprié ou pour assurer la robustesse de l'expression génique de *Nppb/Nppa* face à des perturbations environnementales et/ou des variations génétiques [758, 759]. Chez les primates, l'intégration de l'activité transcriptionnelle commune que les modules US3 et US4 possédaient individuellement au niveau du ventricule gauche pourrait permettre de coordonner plus aisément un output transcriptionnel plus intense dans cette chambre ventriculaire. De surcroît, la composition spécifique en motifs de liaison à l'ADN de

chacun de ces deux enhancers continuerait à assurer l'intégration de différents signaux développementaux au niveau des ventricules qui se traduirait par un output transcriptionnel identique ou distinct de celui fournit par chacun des modules considérés individuellement.

La redondance fonctionnelle des trois enhancers, principalement dans le ventricule gauche, a probablement résulté en un accroissement de la sélection positive au niveau des séquences nucléotidiques et de l'arrangement de ces MCRs au sein du locus *Nppb/Nppa*, autorisant ainsi davantage de dérive génétique. L'identification récente dans le locus *Nppb/Nppa* de séquences intergéniques, distinctes des trois enhancers caractérisés, capables de recruter des facteurs de transcription cardiaques, semble suggérer que la dérive génétique aient été plus considérable que précédemment supposée. Tel qu'anticipé, l'étude d'empreinte phylogénétique n'autorisait nullement l'identification d'enhancer espèce-spécifique, qui aurait nécessité des approches complémentaires à l'instar du criblage pangénomique de multiples facteurs de transcription cardiaques (*Tbx5*, *Gata4*, *Srf*, *Nkx2.5*, *Mef2A*, et *p300*) effectué tout récemment par immunoprécipitation de la chromatine dans la lignée cellulaire cardiaque murine HL1 [760]. Cette étude a essentiellement corroboré le recrutement des facteurs TBX5, GATA4 et SRF au niveau des promoteurs *Nppb/Nppa* et de séquences génomiques chevauchant les trois enhancers que nous avons identifiés. Toutefois, en dehors de la liaison de SRF à US2, de GATA4 à US4, et de TBX5 sur les trois enhancers, cette étude a mis en évidence sept autres séquences au sein du locus *Nppb/Nppa* qui coïncidaient avec des loci génomiques d'enrichissement de TBX5 : les régions identifiées se localisaient dans l'exon 2 et l'intron 2 de *Nppb*, dans un site à 5,5kb en aval de *Nppb*, et dans 4 sites en amont de *Nppb*. Parmi les 4 loci génomiques d'enrichissement de TBX5 en amont de *Nppb*, l'un se situait à environ 316 bp en amont du module US2 tandis que deux autres se positionnaient à 425 bp et 1235 bp en aval du module US3, suggérant que chez la souris exclusivement l'enhancer US2 s'étend probablement davantage en 5' et l'enhancer US3 en 3', étant donné que ces régions sont absentes chez l'humain. En effet, tel que mentionné précédemment, les MCRs US3 et US4 ont fusionnés chez les primates, excluant ainsi la séquence murine intercalée entre US3 et US4 dans laquelle TBX5

est recruté dans deux régions adjacentes à US3 dans l'étude de He *et al.* [760]. Finalement, le quatrième site d'enrichissement de TBX5 chevauchait l'unique autre MCR potentiel que nous avons identifié et nommé US5 lors de l'analyse d'empreinte phylogénétique. Ce MCR n'avait pas été testé en transgénèse à l'époque de sa découverte car seuls 3 motifs de liaison pour des facteurs de transcription ubiquitaires avaient été prédits, ce qui situait ce MCR juste au-dessous de notre seuil de sélection. Grâce à l'enrichissement des bases de données de motifs de liaison à l'ADN (Transfac, Jaspar, etc.), davantage de motifs conservés ont été récemment détectés au sein du module US5, ce qui suggère une fonction *cis*-régulatrice potentielle qui devra être testé *in vivo*. L'empreinte phylogénétique réalisée chez les mammifères au niveau du locus *Nppb/Nppa* a donc démontré son extrême sensibilité dans l'identification d'enhancers conservés entre l'humain, la souris et le rat [689]. Toutefois, cette approche semble avoir échoué dans la détection du ou des enhancer(s) spécifique(s) à chacune des trois espèces utilisées (humain, souris, et rat). En revanche, le criblage pangénomique de multiples facteurs de transcription cardiaques est une approche bien plus complexe et laborieuse que l'empreinte phylogénétique, mais qui a démontré son efficacité dans l'identification de séquences génomiques *cis*-régulatrices au sein du tandem génique murin *Nppb/Nppa* [760]. L'inconvénient majeur du criblage pangénomique par immunoprécipitation de la chromatine est son incapacité à délimiter les bordures précises de chaque enhancer dans l'espèce étudiée, étant donné l'étroitesse et l'étendue approximative des pics d'enrichissement de chaque facteur de transcription. L'étude des modifications épigénétiques du locus *Nppb/Nppa* permettrait de remédier partiellement à ce problème. Une alternative bio-informatique, le "phylogenetic shadowing", autoriserait de déceler des enhancers espèce-spécifiques plus aisément. Toutefois, cette technique nécessite l'accès à de nombreuses séquences génomiques d'espèces phylogénétiquement voisines afin d'être opérationnelle. En l'occurrence, elle requerrait d'amasser les séquences génomiques complètes du locus *Nppb/Nppa* de plusieurs espèces d'hominidés afin d'identifier avec précision les enhancers spécifiques à l'humain. En raison de l'état lacunaire des séquences génomiques des hominidés, notre étude de génomique comparative s'est donc limitée aux espèces mammaliennes (humain, souris, et rat) dont le génome était



quasiment complet. Ces différentes études prouvent que diverses approches complémentaires devront être envisagées afin de déceler et d'annoter l'ensemble des enhancers tissu-spécifiques éparpillés au sein du locus *Nppb/Nppa*, et par extension des autres locus de gènes cardiaques. En revanche, la présence vraisemblable d'enhancers espèce-spécifique au sein du locus *Nppb/Nppa* nécessitera de tenir compte des différences potentielles de la régulation transcriptionnelle des gènes natriurétiques avant d'extrapoler chez l'humain des résultats issus d'études de modèles murins.

La complexité de la régulation transcriptionnelle des gènes cardiaques, exemplifiée dans le cas du tandem génique *Nppb/Nppa* par la présence de plusieurs éléments *cis*-régulateurs modulaires illustre la lente et longue évolution qui a conduit à la genèse d'un cœur à quatre chambres. Les divergences topographiques du tandem de gènes natriurétiques entre les archosauriens et les mammifères reflètent donc l'évolution de la régulation transcriptionnelle de ces gènes conjointement à l'homoplasie de la septation ventriculaire complète. Chez les euthériens, l'assortiment des 3 MCRs aux fonctions transcriptionnelles cardiaques hétérogènes complète et module l'activité transcriptionnelle des promoteurs de *Nppa* et *Nppb*. Ainsi, la régulation spatio-temporelle cardiaque du tandem génique *Nppb/Nppa* semble intégralement coordonnée durant la cardiogénèse grâce à cette collection MCRs. En outre, la fonction redondante de ces 3 MCRs au niveau du ventricule gauche paraît requise afin d'ajuster avec précision le output transcriptionnel. D'ailleurs, des analyses d'immuno-précipitation de la chromatine ont permis de confirmer l'arrangement de différents complexes multi-protéiques au niveau des MCRs, ce qui reflète l'intégration de divers inputs développementaux émanant des ventricules. Les interactions combinatoires entre TBX5 et ces différents complexes multi-protéiques recrutés au niveau des trois MCRs attestent que *Tbx5* est un protagoniste majeur chez les mammifères de la régulation transcriptionnelle dynamique du tandem *Nppb/Nppa* dans les ventricules, et plus particulièrement dans le ventricule gauche. Chez les archosauriens, bien qu'aucun MCR ne soit encore véritablement identifié au niveau du locus *Cnp-3/Rnp/Nppb*, *Tbx5* semble toutefois jouer un rôle crucial dans la régulation de *Nppb* dans le ventricule gauche. La régulation transcriptionnelle de

*Nppb* dans le ventricule droit durant la cardiogénèse du poulet, et par extension des archosauriens, reste toutefois une énigme.

La découverte de MCRs euthériens au niveau du tandem génique *Nppb/Nppa* a permis de confirmer l'hypothèse selon laquelle d'autres séquences *cis*-régulatrices étaient requises chez la souris afin de moduler l'expression ventriculaire de *Nppa* durant la cardiogénèse [619]. Toutefois, certaines questions demeurent quant aux mécanismes moléculaires permettant aux MCRs de réguler l'expression de *Nppb* et/ou *Nppa*. Par ailleurs, il serait intrigant de déterminer si cet assortiment de MCRs se comporte comme une région de contrôle du locus (LCR) afin de moduler la transcription de *Nppb/Nppa* pendant la cardiogénèse et/ou durant des états pathologiques du cœur. Des approches biochimiques, telles que l'essai 4C ou 5C, permettraient de cartographier l'organisation spatiale du locus *Nppb/Nppa* pendant la cardiogénèse et durant les conditions physio- et pathologiques du cœur. Finalement, il reste également à déterminer le rôle précis de *Tbx5* dans la formation de complexes multi-protéiques au niveau de ces MCRs et la manière dont ces MCRs interprètent le gradient d'expression de TBX5 au niveau des ventricules.

## 6.4 Conclusions et perspectives

Une première étude démontre le rôle crucial de la communication croisée entre la sous-population de cellules endocardiques TBX5<sup>+</sup> et les cardiomyocytes au niveau du septum primum afin d'assurer la survie de ces cellules, et par conséquent, la morphogénèse du septum inter-auriculaire. La souris *Tie2-Cre;Tbx5<sup>flox/flox</sup>* autorise donc la dissection des mécanismes moléculaires responsables de la survie des cellules endocardiques/myocardiques indispensables à la genèse du septum inter-auriculaire. En revanche, malgré le rôle capital de *Tbx5* dans la survie des cellules endocardiques bordant le septum inter-auriculaire, ce modèle murin n'éclaire aucunement sur les fonctions de *Tbx5* dans les cardiomyocytes du septum primum. L'ablation de *Tbx5* au niveau des oreillettes pourrait fournir des indices sur les fonctions de *Tbx5* dans les cardiomyocytes du septum primum, bien que cette stratégie risque d'affecter

également le développement du système de conduction cardiaque, notamment au niveau du nœud sinusal et du nœud auriculo-ventriculaire, structures dans lesquelles *Tbx5* est également fortement exprimé. Une autre stratégie consisterait à effectuer l'ablation de *Tbx5* au niveau des progéniteurs du domaine postérieur du CCS, étant donné que l'unique sous-population de progéniteurs cardiogènes *Tbx5*<sup>+</sup> au sein du CCS postérieur contribue aux cardiomyocytes qui incorporent le septum primum. En outre, la démonstration de l'existence d'une interaction génétique entre *Tbx5* et *Gata4* suggère la possibilité d'interaction(s) combinatoire(s) entre ces deux facteurs de transcription au niveau de l'endocarde bordant le septum primum, à l'instar des interactions physiques déjà mises en évidence au niveau des cardiomyocytes. Toutefois, une ablation double de *Tbx5* et *Gata4* au niveau de l'endocarde demeure nécessaire afin de confirmer cette hypothèse. Nos résultats démontrent également l'existence d'une interdépendance génétique entre *Tbx5* et *Nos3* qui témoigne du rôle crucial des interactions génétiques entre différents loci dans la morphogenèse de la cloison inter-auriculaire, et particulièrement de l'influence qu'est susceptible d'avoir l'environnement sur la pénétrance et l'expressivité des CIAs chez les patients atteints du SHO. L'ablation endocardique de *Tbx5* chez la souris, qui n'affecte qu'une unique structure cardiaque (le septum inter-auriculaire) parmi les diverses MCCs répertoriées dans le SHO, fournit donc un modèle murin fondamental pour l'évaluation de l'influence d'autres loci et de l'environnement sur l'émergence de CIAs.

Une deuxième étude focalisée sur la régulation de la transcription de *Tbx5* au niveau du cœur a mis évidence l'existence d'au moins six transcrits alternatifs possédant des fonctions à la fois communes et divergentes. Ces investigations ont révélé l'importance de l'épissage alternatif de *Tbx5* dans la diversification des fonctions moléculaires et cellulaires de ce gène T-box durant l'ontogenèse cardiaque. La caractérisation de deux de ces isoformes alternatifs a démontré l'influence de l'isoforme long (*Tbx5\_v1*) dans la croissance des cardiomyocytes durant la cardiogénèse, tandis que *Tbx5\_v2*, préférentiellement exprimé dans le cœur mature, détient plutôt une fonction de répression de la croissance cellulaire. Il est donc entièrement concevable que les mutations de *TBX5* entraînant une troncation de la région C-terminale accroissent la concentration d'une protéine

mutée qui, à l'instar de *Tbx5\_v2*, interfère avec la croissance de certaines structures cardiaques. En revanche, la divergence de fonctions de ces isoformes, caractérisée par les disparités de localisation subcellulaire et d'interaction avec d'autres cofacteurs cardiaques, atteste de la complexité à identifier des corrélations entre le type de mutation affectant *TBX5* et la pénétrance ou l'expressivité des malformations congénitales répertoriées chez les patients atteints du SHO. La détermination de la compilation de fonctions de chacun de ces isoformes et des interdépendances qu'ils ont les uns envers les autres ou avec d'autres gènes éclairera indubitablement sur des relations génotype-phénotype. Il est parfaitement concevable que certaines mutations altèrent davantage les fonctions d'un isoforme, c'est pourquoi, les nouveaux exons découverts au sein du locus de *Tbx5* devraient être criblés pour des mutations potentielles chez les patients atteints du SHO. L'identification de SNPs, associés à une prolongation de l'intervalle PR chez les humains, avoisinant le nouvel exon 10 suggère en effet que certaines mutations ou polymorphismes pourraient affecter spécifiquement un isoforme et altérant l'épissage alternatif de *TBX5*.

Finalement, l'approche d'empreinte phylogénétique employée pour scanner le locus *Nppb/Nppa* a permis d'identifier trois MCRs conservés entre diverses espèces de mammifères, dont un (US3) est spécifique aux euthériens. Cette étude a ainsi corroboré l'hypothèse que la régulation de l'expression du tandem génique *Nppb/Nppa* requerrait l'activité transcriptionnelle d'autres MCRs en complément des promoteurs de *Nppa* et *Nppb* identifiés depuis déjà trois décennies. L'identification de polymorphismes au sein du locus *Nppb/Nppa* associés à des variations d'expression de ces gènes natriurétiques chez l'humain, notamment un SNP avoisinant US2, supporte le rôle crucial de ces enhancers dans la modulation de l'expression de ces gènes et le risque d'affecté l'homéostasie cardiovasculaire lorsque certaines variations génétiques affectent la fonction de ces éléments *cis*-régulateurs. De surcroît, ces MCRs semblent être requis pour interpréter le gradient d'expression ventriculaire de *Tbx5*, ce qui expliquerait la similarité des profils d'expression entre *Tbx5* et ces deux gènes natriurétiques chez de nombreux vertébrés, et particulièrement chez les mammifères. Par contre, les divergences d'organisation de ces trois MCRs au sein du locus *Nppb/Nppa* dans

les différentes espèces étudiées suggèrent que les outputs transcriptionnels de ces enhancers ont évolué au cours de l'évolution des mammifères. Des comparaisons de l'activité transcriptionnelle de ces différents enhancers devraient donc être réalisées grâce à des souris transgéniques générées avec les enhancers spécifiques aux humains ou aux espèces murines. Finalement, des essais 4C ou 5C permettraient de confirmer l'interaction de ces MCRs avec les promoteurs des gènes natriurétiques durant la cardiogénèse et potentiellement chez l'adulte lorsque le cœur est exposé à des situations physiologiques ou pathologiques. Ces techniques de 4C et 5C pourraient également identifier l'existence d'autres enhancers espèce-spécifique qui demeureraient indétectables par l'approche d'empreinte phylogénétique que nous avons employée.

## Bibliographie

1. Meilhac, S.M., et al., *A retrospective clonal analysis of the myocardium reveals two phases of clonal growth in the developing mouse heart*. Development, 2003. **130**(16): p. 3877-3889.
2. Garcia-Martinez, V. and G.C. Schoenwolf, *Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos*. Developmental Biology, 1993. **159**(2): p. 706-719.
3. Tam, P.P., et al., *The allocation of epiblast cells to the embryonic heart and other mesodermal lineages: the role of ingression and tissue movement during gastrulation*. Development, 1997. **124**(9): p. 1631-1642.
4. Tam, P.P.L. and D.A.F. Loebel, *Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(5): p. 368-381.
5. Schoenwolf, G.C. and V. Garcia-Martinez, *Primitive-streak origin and state of commitment of cells of the cardiovascular system in avian and mammalian embryos*. Cellular & Molecular Biology Research, 1995. **41**(4): p. 233-40.
6. Rawles, M.E., *The heart-forming areas of the early chick blastoderm*. Physiol. Zool., 1943. **16**: p. 22-42.
7. Rosenquist, G.C., *Location and movements of cardiogenic cells in the chick embryo: the heart-forming portion of the primitive streak*. Developmental Biology, 1970. **22**(3): p. 461-475.
8. Yang, X., et al., *Cell movement patterns during gastrulation in the chick are controlled by positive and negative chemotaxis mediated by FGF4 and FGF8*. Developmental Cell, 2002. **3**(3): p. 425-437.

9. Wagner, M. and M.A.Q. Siddiqui, *Signal transduction in early heart development (I): cardiogenic induction and heart tube formation*. Experimental Biology and Medicine, 2007. **232**(7): p. 852-865.
10. Linask, K.K., *N-cadherin localization in early heart development and polar expression of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, and integrin during pericardial coelom formation and epithelialization of the differentiating myocardium*. Developmental Biology, 1992. **151**(1): p. 213-224.
11. Linask, K.K., K.A. Knudsen, and Y.-H. Gui, *N-cadherin-catenin interaction: necessary component of cardiac cell compartmentalization during early vertebrate heart development*. Developmental Biology, 1997. **185**(2): p. 148-164.
12. DeRuiter, M.C., et al., *The development of the myocardium and endocardium in mouse embryos*. Anatomy and Embryology, 1992. **185**(5): p. 461-473.
13. Davis, C.L., *Development of the human heart from its first appearance to the stage found in embryos of twenty paired somites*. Carnegie Institution of Washington Publication 380. Contributions to Embryology, 1927. **19**: p. 245-283.
14. Stalsberg, H. and R.L. DeHaan, *The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo*. Developmental Biology, 1969. **19**(2): p. 128-159.
15. Abu-Issa, R. and M.L. Kirby, *Patterning of the heart field in the chick*. Developmental Biology, 2008. **319**(2): p. 223-233.
16. Zaffran, S., et al., *Right ventricular myocardium derives from the anterior heart field*. Circulation Research, 2004. **95**(3): p. 261-8.

17. Waldo, K.L., et al., *Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field*. Development, 2001. **128**(16): p. 3179-3188.
18. Kelly, R.G., N.A. Brown, and M.E. Buckingham, *The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm*. Developmental Cell, 2001. **1**(3): p. 435-440.
19. Mjaatvedt, C.H., et al., *The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field*. Developmental Biology, 2001. **238**(1): p. 97-109.
20. Cai, C.-L., et al., *Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart*. Developmental Cell, 2003. **5**(6): p. 877-889.
21. Watanabe, Y. and M. Buckingham, *The formation of the embryonic mouse heart: heart fields and myocardial cell lineages*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010. **1188**: p. 15-24.
22. Garry, D.J. and E.N. Olson, *A common progenitor at the heart of development*. Cell, 2006. **127**(6): p. 1101-1104.
23. Jacobson, A.G. and A.K. Sater, *Features of embryonic induction*. Development, 1988. **104**(3): p. 341-359.
24. Nascone, N. and M. Mercola, *An inductive role for the endoderm in Xenopus cardiogenesis*. Development, 1995. **121**(2): p. 515-523.
25. Schultheiss, T.M., S. Xydas, and A.B. Lassar, *Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm*. Development, 1995. **121**(12): p. 4203-4214.
26. Lough, J. and Y. Sugi, *Endoderm and heart development*. Developmental Dynamics, 2000. **217**(4): p. 327-342.



27. Antin, P.B., R.G. Taylor, and T. Yatskievych, *Precardiac mesoderm is specified during gastrulation in quail*. Developmental Dynamics, 1994. **200**(2): p. 144-154.
28. Sugi, Y. and J. Lough, *Anterior endoderm is a specific effector of terminal cardiac myocyte differentiation of cells from the embryonic heart forming region*. Developmental Dynamics, 1994. **200**(2): p. 155-162.
29. Rudy-Reil, D. and J. Lough, *Avian precardiac endoderm/mesoderm induces cardiac myocyte differentiation in murine embryonic stem cells*. Circ Res, 2004. **94**(12): p. e107-116-e107-116.
30. Sugi, Y. and J. Lough, *Activin-A and FGF-2 mimic the inductive effects of anterior endoderm on terminal cardiac myogenesis in vitro*. Developmental Biology, 1995. **168**(2): p. 567-574.
31. Arai, A., K. Yamamoto, and J. Toyama, *Murine cardiac progenitor cells require visceral embryonic endoderm and primitive streak for terminal differentiation*. Developmental Dynamics, 1997. **210**(3): p. 344-353.
32. Tzahor, E. and A.B. Lassar, *Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis*. Genes & Development, 2001. **15**(3): p. 255-60.
33. Climent, S., et al., *Neurogenic cells inhibit the differentiation of cardiogenic cells*. Developmental Biology, 1995. **171**(1): p. 130-148.
34. Raffin, M., et al., *Subdivision of the cardiac Nkx2.5 expression domain into myogenic and nonmyogenic compartments*. Developmental Biology, 2000. **218**(2): p. 326-340.
35. Klaus, A., et al., *Distinct roles of Wnt/ $\beta$ -catenin and Bmp signaling during early cardiogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(47): p. 18531-18536.

36. Schlange, T., et al., *BMP2 is required for early heart development during a distinct time period*. Mechanisms of Development, 2000. **91**(1-2): p. 259-270.
37. Ladd, A.N., T.A. Yatskievych, and P.B. Antin, *Regulation of avian cardiac myogenesis by activin/TGFbeta and bone morphogenetic proteins*. Developmental Biology, 1998. **204**(2): p. 407-419.
38. Schultheiss, T.M., J.B. Burch, and A.B. Lassar, *A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis*. Genes & Development, 1997. **11**(4): p. 451-62.
39. Barron, M., M. Gao, and J. Lough, *Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative*. Developmental Dynamics, 2000. **218**(2): p. 383-393.
40. Ciruna, B. and J. Rossant, *FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak*. Developmental Cell, 2001. **1**(1): p. 37-49.
41. Yamaguchi, T.P., et al., *fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation*. Genes & Development, 1994. **8**(24): p. 3032-44.
42. Deng, C.X., et al., *Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization*. Genes & Development, 1994. **8**(24): p. 3045-57.
43. Sun, X., et al., *Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo*. Genes & Development, 1999. **13**(14): p. 1834-46.

44. Lough, J., et al., *Combined BMP-2 and FGF-4, but neither factor alone, induces cardiogenesis in non-precardiac embryonic mesoderm*. Developmental Biology, 1996. **178**(1): p. 198-202.
45. Crossley, P.H. and G.R. Martin, *The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo*. Development, 1995. **121**(2): p. 439-451.
46. Abu-Issa, R., et al., *Fgf8 is required for pharyngeal arch and cardiovascular development in the mouse*. Development, 2002. **129**(19): p. 4613-4625.
47. Macatee, T.L., et al., *Ablation of specific expression domains reveals discrete functions of ectoderm- and endoderm-derived FGF8 during cardiovascular and pharyngeal development*. Development, 2003. **130**(25): p. 6361-6374.
48. Brown, C.B., et al., *Cre-mediated excision of Fgf8 in the Tbx1 expression domain reveals a critical role for Fgf8 in cardiovascular development in the mouse*. Developmental Biology, 2004. **267**(1): p. 190-202.
49. Park, E.J., et al., *Required, tissue-specific roles for Fgf8 in outflow tract formation and remodeling*. Development, 2006. **133**(12): p. 2419-2433.
50. Ilagan, R., et al., *Fgf8 is required for anterior heart field development*. Development, 2006. **133**(12): p. 2435-2445.
51. Frank, D.U., et al., *An Fgf8 mouse mutant phenocopies human 22q11 deletion syndrome*. Development, 2002. **129**(19): p. 4591-4603.
52. Ryckebusch, L., et al., *Retinoic acid deficiency alters second heart field formation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(8): p. 2913-2918.

53. Sirbu, I.O., X. Zhao, and G. Duester, *Retinoic acid controls heart anteroposterior patterning by down-regulating Isl1 through the Fgf8 pathway*. Developmental Dynamics, 2008. **237**(6): p. 1627-1635.
54. Ueno, S., et al., *Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(23): p. 9685-9690.
55. Wu, S.M., *Mesp1 at the heart of mesoderm lineage specification*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(1): p. 1-2.
56. Marvin, M.J., et al., *Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm*. Genes & Development, 2001. **15**(3): p. 316-27.
57. Pfeffer, P.L., E.M. De Robertis, and J.C. Izpisua-Belmonte, *Crescent, a novel chick gene encoding a Frizzled-like cysteine-rich domain, is expressed in anterior regions during early embryogenesis*. The International Journal of Developmental Biology, 1997. **41**(3): p. 449-58.
58. Glinka, A., et al., *Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction*. Nature, 1998. **391**(6665): p. 357-62.
59. Monaghan, A.P., et al., *Dickkopf genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages*. Mechanisms of Development, 1999. **87**(1-2): p. 45-56.
60. Schneider, V.A. and M. Mercola, *Wnt antagonism initiates cardiogenesis in Xenopus laevis*. Genes & Development, 2001. **15**(3): p. 304-15.
61. Han, Z. and R. Bodmer, *Myogenic cells fates are antagonized by Notch only in asymmetric lineages of the Drosophila heart, with or without cell division*. Development, 2003. **130**(13): p. 3039-3051.

62. Ronces, M.S., et al., *Serrate and Notch specify cell fates in the heart field by suppressing cardiomyogenesis*. Development, 2000. **127**(17): p. 3865-3876.
63. Schroeder, T., et al., *Recombination signal sequence-binding protein Jk alters mesodermal cell fate decisions by suppressing cardiomyogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(7): p. 4018-4023.
64. Souilhol, C., et al., *RBP-Jkappa-dependent notch signaling is dispensable for mouse early embryonic development*. Mol. Cell. Biol., 2006. **26**(13): p. 4769-4774.
65. Shi, S., et al., *Canonical Notch signaling is dispensable for early cell fate specifications in mammals*. Mol. Cell. Biol., 2005. **25**(21): p. 9503-9508.
66. Krebs, L.T., et al., *Notch signaling regulates left-right asymmetry determination by inducing Nodal expression*. Genes & Development, 2003. **17**(10): p. 1207-1212.
67. Przemeck, G.K.H., et al., *Node and midline defects are associated with left-right development in Delta1 mutant embryos*. Development, 2003. **130**(1): p. 3-13.
68. Jang, J., et al., *Notch inhibition promotes human embryonic stem cell-derived cardiac mesoderm differentiation*. Stem Cells, 2008. **26**(11): p. 2782-2790.
69. Nemir, M., et al., *Induction of cardiogenesis in embryonic stem cells via downregulation of Notch1 signaling*. Circ Res, 2006. **98**(12): p. 1471-1478.
70. Schroeder, T., et al., *Activated Notch1 alters differentiation of embryonic stem cells into mesodermal cell lineages at multiple stages of development*. Mechanisms of Development, 2006. **123**(7): p. 570-579.

71. Park, M., L.E. Yaich, and R. Bodmer, *Mesodermal cell fate decisions in Drosophila are under the control of the lineage genes numb, Notch, and sanpodo*. Mechanisms of Development, 1998. **75**(1-2): p. 117-126.
72. Watanabe, Y., et al., *Activation of Notch1 signaling in cardiogenic mesoderm induces abnormal heart morphogenesis in mouse*. Development, 2006. **133**(9): p. 1625-1634.
73. Grego-Bessa, J., et al., *Notch signaling is essential for ventricular chamber development*. Developmental Cell, 2007. **12**(3): p. 415-429.
74. Sugi, Y. and R.R. Markwald, *Formation and early morphogenesis of endocardial endothelial precursor cells and the role of endoderm*. Developmental Biology, 1996. **175**(1): p. 66-83.
75. Fong, G.-H., et al., *Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium*. Nature, 1995. **376**(6535): p. 66-70.
76. Shalaby, F., et al., *Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice*. Nature, 1995. **376**(6535): p. 62-66.
77. van den Hoff, M.J.B., B.P.T. Kruithof, and A.F.M. Moorman, *Making more heart muscle*. BioEssays, 2004. **26**(3): p. 248-261.
78. Christoffels, V.M., et al., *Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart*. Developmental Biology, 2000. **223**(2): p. 266-278.
79. Männer, J., *The anatomy of cardiac looping: a step towards the understanding of the morphogenesis of several forms of congenital cardiac malformations*. Clinical Anatomy, 2009. **22**(1): p. 21-35.
80. Sissman, N.J., *Cell multiplication rates during development of the primitive cardiac tube in the chick embryo*. Nature, 1966. **210**(5035): p. 504-7.

81. van den Berg, G., et al., *A caudal proliferating growth center contributes to both poles of the forming heart tube*. Circulation Research, 2009. **104**(2): p. 179-88.
82. Soufan, A.T., et al., *Regionalized sequence of myocardial cell growth and proliferation characterizes early chamber formation*. Circ Res, 2006. **99**(5): p. 545-552.
83. de La Cruz, M.V., C. Sánchez-Gómez, and M.A. Palomino, *The primitive cardiac regions in the straight tube heart (Stage 9-) and their anatomical expression in the mature heart: An experimental study in the chick embryo*. Journal of Anatomy, 1989. **165**: p. 121-131.
84. de la Cruz, M.V., et al., *Experimental study of the development of the truncus and the conus in the chick embryo*. Journal of Anatomy, 1977. **123**(Pt 3): p. 661-686.
85. Virágh, S. and C.E. Challice, *Origin and differentiation of cardiac muscle cells in the mouse*. Journal of Ultrastructure Research, 1973. **42**(1-2): p. 1-24.
86. Argüello, C., M.V. de la Cruz, and C.S. Gómez, *Experimental study of the formation of the heart tube in the chick embryo*. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 1975. **33**(1): p. 1-11.
87. Verzi, M.P., et al., *The right ventricle, outflow tract, and ventricular septum comprise a restricted expression domain within the secondary/anterior heart field*. Developmental Biology, 2005. **287**(1): p. 134-145.
88. Moorman, A.F.M. and V.M. Christoffels, *Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution*. Physiol. Rev., 2003. **83**(4): p. 1223-1267.

89. Alcoléa, S., et al., *Downregulation of connexin 45 gene products during mouse heart development*. Circ Res, 1999. **84**(12): p. 1365-1379.
90. Delorme, B., et al., *Expression pattern of connexin gene products at the early developmental stages of the mouse cardiovascular system*. Circ Res, 1997. **81**(3): p. 423-437.
91. Hirota, A., et al., *Initial development of conduction pattern of spontaneous action potential in early embryonic precontractile chick heart*. Developmental Biology, 1983. **99**(2): p. 517-523.
92. Argüello, C., et al., *Electrophysiological and ultrastructural study of the atrioventricular canal during the development of the chick embryo*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1986. **18**(5): p. 499-510.
93. de Jong, F., et al., *Persisting zones of slow impulse conduction in developing chicken hearts*. Circ Res, 1992. **71**(2): p. 240-250.
94. Van Kempen, M.J.A., et al., *Developmental changes of connexin40 and connexin43 mRNA distribution patterns in the rat heart*. Cardiovasc Res, 1996. **32**(5): p. 886-900.
95. Aanhaanen, W.T.J., et al., *The Tbx2+ primary myocardium of the atrioventricular canal forms the atrioventricular node and the base of the left ventricle*. Circulation Research, 2009. **104**(11): p. 1267-1274.
96. Meilhac, S.M., et al., *Oriented clonal cell growth in the developing mouse myocardium underlies cardiac morphogenesis*. J. Cell Biol., 2004. **164**(1): p. 97-109.
97. Meilhac, S.M., et al., *The clonal origin of myocardial cells in different regions of the embryonic mouse heart*. Developmental Cell, 2004. **6**(5): p. 685-698.



98. Lopez-Sanchez, C., V. Garcia-Martinez, and G.C. Schoenwolf, *Localization of cells of the prospective neural plate, heart and somites within the primitive streak and epiblast of avian embryos at intermediate primitive-streak stages*. Cells, Tissues, Organs, 2001. **169**(4): p. 334-46.
99. Inagaki, T., V. Garcia-Martinez, and G.C. Schoenwolf, *Regulative ability of the prospective cardiogenic and vasculogenic areas of the primitive streak during avian gastrulation*. Developmental Dynamics, 1993. **197**(1): p. 57-68.
100. Redkar, A., M. Montgomery, and J. Litvin, *Fate map of early avian cardiac progenitor cells*. Development, 2001. **128**(12): p. 2269-2279.
101. Ehrman, L.A. and K.E. Yutzey, *Lack of regulation in the heart forming region of avian embryos*. Developmental Biology, 1999. **207**(1): p. 163-175.
102. Cui, C., et al., *Dynamic positional fate map of the primary heart-forming region*. Developmental Biology, 2009. **332**(2): p. 212-222.
103. Satin, J., S. Fujii, and R.L. DeHaan, *Development of cardiac beat rate in early chick embryos is regulated by regional cues*. Developmental Biology, 1988. **129**(1): p. 103-113.
104. Yutzey, K.E., M. Gannon, and D. Bader, *Diversification of cardiomyogenic cell lineages in vitro*. Developmental Biology, 1995. **170**(2): p. 531-541.
105. Patwardhan, V., et al., *The rostro-caudal position of cardiac myocytes affect their fate*. Developmental Dynamics, 2000. **218**(1): p. 123-135.
106. Christoffels, V.M., J.B.E. Burch, and A.F.M. Moorman, *Architectural plan for the heart: early patterning and delineation of the chambers and the nodes*. Trends in Cardiovascular Medicine, 2004. **14**(8): p. 301-307.

107. Stainier, D.Y.R. and M.C. Fishman, *Patterning the zebrafish heart tube: acquisition of anteroposterior polarity*. Developmental Biology, 1992. **153**(1): p. 91-101.
108. Osmond, M.K., et al., *The effects of retinoic acid on heart formation in the early chick embryo*. Development, 1991. **113**(4): p. 1405-1417.
109. Yutzey, K.E., J.T. Rhee, and D. Bader, *Expression of the atrial-specific myosin heavy chain AMHC1 and the establishment of anteroposterior polarity in the developing chicken heart*. Development, 1994. **120**(4): p. 871-883.
110. Xavier-Neto, J., et al., *A retinoic acid-inducible transgenic marker of sino-atrial development in the mouse heart*. Development, 1999. **126**(12): p. 2677-2687.
111. Twal, W., L. Roze, and M.H. Zile, *Anti-retinoic acid monoclonal antibody localizes all-trans-retinoic acid in target cells and blocks normal development in early quail embryo*. Developmental Biology, 1995. **168**(2): p. 225-234.
112. Kostetskii, I., et al., *Retinoid signaling required for normal heart development regulates GATA-4 in a pathway distinct from cardiomyocyte differentiation*. Developmental Biology, 1999. **206**(2): p. 206-218.
113. Zhao, D., et al., *Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase*. European Journal of Biochemistry, 1996. **240**(1): p. 15-22.
114. Moss, J.B., et al., *Dynamic patterns of retinoic acid synthesis and response in the developing mammalian heart*. Developmental Biology, 1998. **199**(1): p. 55-71.

115. Niederreither, K., et al., *Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development*. Nat Genet, 1999. **21**(4): p. 444-448.
116. Xavier-Neto, J., et al., *Sequential programs of retinoic acid synthesis in the myocardial and epicardial layers of the developing avian heart*. Developmental Biology, 2000. **219**(1): p. 129-141.
117. Hochgreb, T., et al., *A caudorostral wave of RALDH2 conveys anteroposterior information to the cardiac field*. Development, 2003. **130**(22): p. 5363-5374.
118. Niederreither, K., et al., *Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development*. Mechanisms of Development, 1997. **62**(1): p. 67-78.
119. Niederreither, K., et al., *Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse*. Development, 2001. **128**(7): p. 1019-1031.
120. Rosenthal, N. and J. Xavier-Neto, *From the bottom of the heart: anteroposterior decisions in cardiac muscle differentiation*. Current Opinion in Cell Biology, 2000. **12**(6): p. 742-746.
121. Xavier-Neto, J., et al., *Retinoid signaling and cardiac anteroposterior segmentation*. genesis, 2001. **31**(3): p. 97-104.
122. Keegan, B.R., et al., *Retinoic acid signaling restricts the cardiac progenitor pool*. Science, 2005. **307**(5707): p. 247-249.
123. Thomas, T., et al., *The bHLH factors, dHAND and eHAND, specify pulmonary and systemic cardiac ventricles independent of left-right sidedness*. Developmental Biology, 1998. **196**(2): p. 228-236.

124. Firulli, A.B., et al., *Heart and extra-embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor Hand1*. Nature Genetics, 1998. **18**(3): p. 266-70.
125. Riley, P., L. Anson-Cartwright, and J.C. Cross, *The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis*. Nature Genetics, 1998. **18**(3): p. 271-5.
126. Riley, P.R., et al., *Early exclusion of hand1-deficient cells from distinct regions of the left ventricular myocardium in chimeric mouse embryos*. Developmental Biology, 2000. **227**(1): p. 156-168.
127. Houweling, A.C., et al., *Developmental pattern of ANF gene expression reveals a strict localization of cardiac chamber formation in chicken*. The Anatomical Record, 2002. **266**(2): p. 93-102.
128. Zeller, R., et al., *Localized expression of the atrial natriuretic factor gene during cardiac embryogenesis*. Genes & Development, 1987. **1**(7): p. 693-8.
129. Palmer, S., et al., *The small muscle-specific protein Csl modifies cell shape and promotes myocyte fusion in an insulin-like growth factor 1-dependent manner*. J. Cell Biol., 2001. **153**(5): p. 985-998.
130. Dunwoodie, S.L., T.A. Rodriguez, and R.S.P. Beddington, *Msg1 and Mrg1, founding members of a gene family, show distinct patterns of gene expression during mouse embryogenesis*. Mechanisms of Development, 1998. **72**(1-2): p. 27-40.
131. Raya, A. and J.C.I. Belmonte, *Left-right asymmetry in the vertebrate embryo: from early information to higher-level integration*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(4): p. 283-293.

132. Stalsberg, H., *The origin of heart asymmetry: right and left contributions to the early chick embryo heart*. Developmental Biology, 1969. **19**(2): p. 109-127.
133. Rohr, S., C. Otten, and S. Abdelilah-Seyfried, *Asymmetric involution of the myocardial field drives heart tube formation in zebrafish*. Circ Res, 2008. **102**(2): p. e12-19-e12-19.
134. Rongish, B.J., et al., *Identification of the developmental marker, JB3-antigen, as fibrillin-2 and its de novo organization into embryonic microfibrinous arrays*. Developmental Dynamics, 1998. **212**(3): p. 461-471.
135. Smith, S.M., et al., *Retinoic acid directs cardiac laterality and the expression of early markers of precardiac asymmetry*. Developmental Biology, 1997. **182**(1): p. 162-171.
136. Tsuda, T., et al., *Left-right asymmetric localization of flectin in the extracellular matrix during heart looping*. Developmental Biology, 1996. **173**(1): p. 39-50.
137. St. Amand, T.R., et al., *Cloning and expression pattern of chicken Pitx2: a new component in the SHH signaling pathway controlling embryonic heart looping*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998. **247**(1): p. 100-105.
138. Campione, M., et al., *Pitx2 expression defines a left cardiac lineage of cells: evidence for atrial and ventricular molecular isomerism in the iv/iv mice*. Developmental Biology, 2001. **231**(1): p. 252-264.
139. Yoshioka, H., et al., *Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry*. Cell, 1998. **94**(3): p. 299-305.

140. Piedra, M.E., et al., *Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry*. Cell, 1998. **94**(3): p. 319-324.
141. Logan, M., et al., *The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals*. Cell, 1998. **94**(3): p. 307-317.
142. Gage, P.J., H. Suh, and S.A. Camper, *Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs*. Development, 1999. **126**(20): p. 4643-4651.
143. Kitamura, K., et al., *Mouse Pitx2 deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, extra- and periocular mesoderm and right pulmonary isomerism*. Development, 1999. **126**(24): p. 5749-5758.
144. Liu, C., et al., *Regulation of left-right asymmetry by thresholds of Pitx2c activity*. Development, 2001. **128**(11): p. 2039-2048.
145. Liu, C., et al., *Pitx2c patterns anterior myocardium and aortic arch vessels and is required for local cell movement into atrioventricular cushions*. Development, 2002. **129**(21): p. 5081-5091.
146. Galli, D., et al., *Atrial myocardium derives from the posterior region of the second heart field, which acquires left-right identity as Pitx2c is expressed*. Development, 2008. **135**(6): p. 1157-1167.
147. Snarr, B.S., et al., *Isl1 expression at the venous pole identifies a novel role for the second heart field in cardiac development*. Circ Res, 2007. **101**(10): p. 971-974.
148. Goddeeris, M.M., et al., *Intracardiac septation requires hedgehog-dependent cellular contributions from outside the heart*. Development, 2008. **135**(10): p. 1887-1895.

149. Snarr, B.S., et al., *A spatiotemporal evaluation of the contribution of the dorsal mesenchymal protrusion to cardiac development*. Developmental Dynamics, 2007. **236**(5): p. 1287-1294.
150. Kim, J.S., et al., *Development of the myocardium of the atrioventricular canal and the vestibular spine in the human heart*. Circulation Research, 2001. **88**(4): p. 395-402.
151. Wessels, A., et al., *Atrial development in the human heart: an immunohistochemical study with emphasis on the role of mesenchymal tissues*. The Anatomical Record, 2000. **259**(3): p. 288-300.
152. Wessels, A., et al., *The development of the atrioventricular junction in the human heart*. Circ Res, 1996. **78**(1): p. 110-117.
153. Lamers, W.H. and A.F.M. Moorman, *Cardiac septation: a late contribution of the embryonic primary myocardium to heart morphogenesis*. Circ Res, 2002. **91**(2): p. 93-103.
154. Anderson, R.H., et al., *Development of the heart: (2) Septation of the atriums and ventricles*. Heart, 2003. **89**(8): p. 949-958.
155. Calvert, P.A., et al., *Patent foramen ovale: anatomy, outcomes, and closure*. Nature Reviews. Cardiology, 2011. **8**(3): p. 148-160.
156. Schneider, B., et al., *Diagnosis of patent foramen ovale by transesophageal echocardiography and correlation with autopsy findings*. The American Journal of Cardiology, 1996. **77**(14): p. 1202-1209.
157. Hagen, P.T., D.G. Scholz, and W.D. Edwards, *Incidence and size of patent foramen ovale during the first 10 decades of life: an autopsy study of 965 normal hearts*. Mayo Clinic Proceedings. Mayo Clinic, 1984. **59**(1): p. 17-20.

158. McGaw, D. and R. Harper, *Patent foramen ovale and cryptogenic cerebral infarction*. Internal Medicine Journal, 2001. **31**(1): p. 42-47.
159. Wilmshurst, P.T., et al., *Inheritance of persistent foramen ovale and atrial septal defects and the relation to familial migraine with aura*. Heart (British Cardiac Society), 2004. **90**(11): p. 1315-1320.
160. Tsimikas, S., *Transcatheter closure of patent foramen ovale for migraine prophylaxis: hope or hype?* Journal of the American College of Cardiology, 2005. **45**(4): p. 496-498.
161. Wilmshurst, P., et al., *Relation between inheritance of cyanotic congenital heart disease and persistent foramen ovale*. The American Journal of Cardiology, 2009. **104**(1): p. 148-149.
162. Wahl, A. and B. Meier, *Patent foramen ovale and ventricular septal defect closure*. Heart, 2009. **95**(1): p. 70-82.
163. Contreras-Ramos, A., et al., *Normal development of the muscular region of the interventricular septum - I. The significance of the ventricular trabeculations*. Anatomia, Histologia, Embryologia, 2008. **37**(5): p. 344-351.
164. Snarr, B.S., C.B. Kern, and A. Wessels, *Origin and fate of cardiac mesenchyme*. Developmental Dynamics, 2008. **237**(10): p. 2804-2819.
165. Nakamura, T., M.C. Colbert, and J. Robbins, *Neural crest cells retain multipotential characteristics in the developing valves and label the cardiac conduction system*. Circ Res, 2006. **98**(12): p. 1547-1554.
166. Kelly, R.G. and M.E. Buckingham, *The anterior heart-forming field: voyage to the arterial pole of the heart*. Trends in Genetics, 2002. **18**(4): p. 210-216.
167. Webb, S., et al., *Septation and separation within the outflow tract of the developing heart*. Journal of Anatomy, 2003. **202**(4): p. 327-342.



168. Hutson, M.R. and M.L. Kirby, *Model systems for the study of heart development and disease. Cardiac neural crest and conotruncal malformations*. Seminars in cell & developmental biology, 2007. **18**(1): p. 101-110.
169. Bajolle, F., et al., *Rotation of the myocardial wall of the outflow tract is implicated in the normal positioning of the great arteries*. Circ Res, 2006. **98**(3): p. 421-428.
170. Lomonico, M.P., G.W. Moore, and G.M. Hutchins, *Rotation of the junction of the outflow tract and great arteries in the embryonic human heart*. The Anatomical Record, 1986. **216**(4): p. 544-549.
171. Dor, X. and P. Corone, *Migration and torsions of the conotruncus in the chick embryo heart: observational evidence and conclusions drawn from experimental intervention*. Heart and Vessels, 1985. **1**(4): p. 195-211.
172. Thompson, R.P., V. Abercrombie, and M. Wong, *Morphogenesis of the truncus arteriosus of the chick embryo heart: movements of autoradiographic tattoos during septation*. The Anatomical Record, 1987. **218**(4): p. 434-440, 394-395-434-440, 394-395.
173. Goor, D.A., R. Dische, and C.W. Lillehei, *The conotruncus. I. Its normal inversion and conus absorption*. Circulation, 1972. **46**(2): p. 375-384.
174. Ya, J., et al., *Normal development of the outflow tract in the rat*. Circ Res, 1998. **82**(4): p. 464-472.
175. van den Hoff, M.J.B., et al., *Myocardialization of the cardiac outflow tract*. Developmental Biology, 1999. **212**(2): p. 477-490.
176. Jiang, X., et al., *Fate of the mammalian cardiac neural crest*. Development, 2000. **127**(8): p. 1607-1616.

177. de Lange, F.J., et al., *Lineage and morphogenetic analysis of the cardiac valves*. Circ Res, 2004. **95**(6): p. 645-654.
178. Abu-Issa, R. and M.L. Kirby, *Heart field: from mesoderm to heart tube*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2007. **23**: p. 45-68.
179. Saga, Y., et al., *MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube*. Development, 1999. **126**(15): p. 3437-3447.
180. Saga, Y., S. Kitajima, and S. Miyagawa-Tomita, *Mesp1 expression is the earliest sign of cardiovascular development*. Trends in Cardiovascular Medicine, 2000. **10**(8): p. 345-352.
181. Kitajima, S., et al., *MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm*. Development, 2000. **127**(15): p. 3215-3226.
182. Motoike, T., et al., *Evidence for novel fate of Flk1+ progenitor: contribution to muscle lineage*. genesis, 2003. **35**(3): p. 153-159.
183. Ema, M., S. Takahashi, and J. Rossant, *Deletion of the selection cassette, but not cis-acting elements, in targeted Flk1-lacZ allele reveals Flk1 expression in multipotent mesodermal progenitors*. Blood, 2006. **107**(1): p. 111-117.
184. Mohamed, O.A., H.J. Clarke, and D. Dufort, *Beta-catenin signaling marks the prospective site of primitive streak formation in the mouse embryo*. Developmental Dynamics, 2004. **231**(2): p. 416-424.
185. Lindsley, R.C., et al., *Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm*. Development, 2006. **133**(19): p. 3787-3796.

186. Naito, A.T., et al., *Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(52): p. 19812-19817.
187. Wang, H., et al., *Wnt2 coordinates the commitment of mesoderm to hematopoietic, endothelial, and cardiac lineages in embryoid bodies*. J. Biol. Chem., 2007. **282**(1): p. 782-791.
188. Lin, L., et al., *Beta-catenin directly regulates Islet1 expression in cardiovascular progenitors and is required for multiple aspects of cardiogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(22): p. 9313-9318.
189. Cohen, E.D., et al., *Wnt/beta-catenin signaling promotes expansion of Isl-1-positive cardiac progenitor cells through regulation of FGF signaling*. The Journal of Clinical Investigation, 2007. **117**(7): p. 1794-804.
190. Ai, D., et al., *Canonical Wnt signaling functions in second heart field to promote right ventricular growth*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(22): p. 9319-9324.
191. Qyang, Y., et al., *The renewal and differentiation of Isl1+ cardiovascular progenitors are controlled by a Wnt/beta-catenin pathway*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(2): p. 165-179.
192. Kwon, C., et al., *Canonical Wnt signaling is a positive regulator of mammalian cardiac progenitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(26): p. 10894-10899.
193. Bondue, A., et al., *Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(1): p. 69-84.
194. Auda-Boucher, G., et al., *Staging of the commitment of murine cardiac cell progenitors*. Developmental Biology, 2000. **225**(1): p. 214-225.

195. Gannon, M. and D. Bader, *Initiation of cardiac differentiation occurs in the absence of anterior endoderm*. Development, 1995. **121**(8): p. 2439-2450.
196. Montgomery, M.O., et al., *Staging of commitment and differentiation of avian cardiac myocytes*. Developmental Biology, 1994. **164**(1): p. 63-71.
197. Gonzalez-Sanchez, A. and D. Bader, *In vitro analysis of cardiac progenitor cell differentiation*. Developmental Biology, 1990. **139**(1): p. 197-209.
198. Yatskievych, T.A., A.N. Ladd, and P.B. Antin, *Induction of cardiac myogenesis in avian pregastrula epiblast: the role of the hypoblast and activin*. Development, 1997. **124**(13): p. 2561-2570.
199. Kirby, M.L., T.F. Gale, and D.E. Stewart, *Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation*. Science (New York, N.Y.), 1983. **220**(4601): p. 1059-61.
200. Phillips, M.T., M.L. Kirby, and G. Forbes, *Analysis of cranial neural crest distribution in the developing heart using quail-chick chimeras*. Circ Res, 1987. **60**(1): p. 27-30.
201. Epstein, J.A., et al., *Migration of cardiac neural crest cells in Splotch embryos*. Development, 2000. **127**(9): p. 1869-1878.
202. Waldo, K.L., C.W. Lo, and M.L. Kirby, *Connexin 43 expression reflects neural crest patterns during cardiovascular development*. Developmental Biology, 1999. **208**(2): p. 307-323.
203. Fukiishi, Y. and G.M. Morriss-Kay, *Migration of cranial neural crest cells to the pharyngeal arches and heart in rat embryos*. Cell and Tissue Research, 1992. **268**(1): p. 1-8.

204. Miyagawa-Tomita, S., et al., *Temporospatial study of the migration and distribution of cardiac neural crest in quail-chick chimeras*. The American Journal of Anatomy, 1991. **192**(1): p. 79-88.
205. Le Lièvre, C.S. and N.M. Le Douarin, *Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos*. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 1975. **34**(1): p. 125-154.
206. Beall, A.C. and T.H. Rosenquist, *Smooth muscle cells of neural crest origin form the aorticopulmonary septum in the avian embryo*. The Anatomical Record, 1990. **226**(3): p. 360-366.
207. Bergwerff, M., et al., *Neural crest cell contribution to the developing circulatory system: implications for vascular morphology?* Circulation Research, 1998. **82**(2): p. 221-231.
208. Hildreth, V., et al., *Cells migrating from the neural crest contribute to the innervation of the venous pole of the heart*. Journal of Anatomy, 2008. **212**(1): p. 1-11.
209. Verberne, M.E., A.C. Gittenberger-de Groot, and R.E. Poelmann, *Lineage and development of the parasympathetic nervous system of the embryonic chick heart*. Anatomy and Embryology, 1998. **198**(3): p. 171-184.
210. Kirby, M.L. and D.E. Stewart, *Neural crest origin of cardiac ganglion cells in the chick embryo: identification and extirpation*. Developmental Biology, 1983. **97**(2): p. 433-443.
211. Poelmann, R.E. and A.C. Gittenberger-de Groot, *A subpopulation of apoptosis-prone cardiac neural crest cells targets to the venous pole: multiple functions in heart development?* Developmental Biology, 1999. **207**(2): p. 271-286.

212. Gurjarpadhye, A., et al., *Cardiac neural crest ablation inhibits compaction and electrical function of conduction system bundles*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(3): p. H1291-1300-H1291-1300.
213. Asai, R., et al., *Endothelin receptor type A expression defines a distinct cardiac subdomain within the heart field and is later implicated in chamber myocardium formation*. Development (Cambridge, England), 2010. **137**(22): p. 3823-3833.
214. Hu, T., et al., *Tbx1 regulates fibroblast growth factors in the anterior heart field through a reinforcing autoregulatory loop involving forkhead transcription factors*. Development, 2004. **131**(21): p. 5491-5502.
215. Guo, C., et al., *A Tbx1-Six1/Eya1-Fgf8 genetic pathway controls mammalian cardiovascular and craniofacial morphogenesis*. The Journal of Clinical Investigation, 2011.
216. Watanabe, Y., et al., *Role of mesodermal FGF8 and FGF10 overlaps in the development of the arterial pole of the heart and pharyngeal arch arteries*. Circulation Research, 2010. **106**(3): p. 495-503.
217. von Both, I., et al., *Foxh1 is essential for development of the anterior heart field*. Developmental Cell, 2004. **7**(3): p. 331-345.
218. Srivastava, D., et al., *Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND*. Nat Genet, 1997. **16**(2): p. 154-160.
219. Tsuchihashi, T., et al., *Hand2 function in second heart field progenitors is essential for cardiogenesis*. Developmental Biology, 2011. **351**(1): p. 62-69.
220. Lin, Q., et al., *Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C*. Science, 1997. **276**(5317): p. 1404-1407.

- 221. Dodou, E., et al., *Mef2c is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development.* Development, 2004. **131**(16): p. 3931-3942.
- 222. Garg, V., et al., *Tbx1, a DiGeorge syndrome candidate gene, is regulated by sonic hedgehog during pharyngeal arch development.* Developmental Biology, 2001. **235**(1): p. 62-73.
- 223. Jerome, L.A. and V.E. Papaioannou, *DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1.* Nat Genet, 2001. **27**(3): p. 286-291.
- 224. Lindsay, E.A., et al., *Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice.* Nature, 2001. **410**(6824): p. 97-101.
- 225. Merscher, S., et al., *TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velocardio-facial/DiGeorge syndrome.* Cell, 2001. **104**(4): p. 619-629.
- 226. Xu, H., et al., *Tbx1 has a dual role in the morphogenesis of the cardiac outflow tract.* Development, 2004. **131**(13): p. 3217-3227.
- 227. Vitelli, F., et al., *A genetic link between Tbx1 and fibroblast growth factor signaling.* Development, 2002. **129**(19): p. 4605-4611.
- 228. Kelly, R.G. and V.E. Papaioannou, *Visualization of outflow tract development in the absence of Tbx1 using an Fgf10 enhancer trap transgene.* Developmental Dynamics, 2007. **236**(3): p. 821-828.
- 229. Lindsay, E.A., et al., *Congenital heart disease in mice deficient for the DiGeorge syndrome region.* Nature, 1999. **401**(6751): p. 379-383.
- 230. Takeuchi, J.K., et al., *Tbx20 dose-dependently regulates transcription factor networks required for mouse heart and motoneuron development.* Development, 2005. **132**(10): p. 2463-2474.

231. Stennard, F.A., et al., *Murine T-box transcription factor Tbx20 acts as a repressor during heart development, and is essential for adult heart integrity, function and adaptation*. Development, 2005. **132**(10): p. 2451-2462.
232. Singh, M.K., et al., *Tbx20 is essential for cardiac chamber differentiation and repression of Tbx2*. Development, 2005. **132**(12): p. 2697-2707.
233. Cai, C.-L., et al., *T-box genes coordinate regional rates of proliferation and regional specification during cardiogenesis*. Development, 2005. **132**(10): p. 2475-2487.
234. Yuan, S. and G.C. Schoenwolf, *Islet-1 marks the early heart rudiments and is asymmetrically expressed during early rotation of the foregut in the chick embryo*. The Anatomical Record, 2000. **260**(2): p. 204-207.
235. Rana, M.S., et al., *Trabeculated right ventricular free wall in the chicken heart forms by ventricularization of the myocardium initially forming the outflow tract*. Circ Res, 2007. **100**(7): p. 1000-1007.
236. Abu-Issa, R., K. Waldo, and M.L. Kirby, *Heart fields: one, two or more?* Developmental Biology, 2004. **272**(2): p. 281-285.
237. Moorman, A.F.M., et al., *The heart-forming fields: one or multiple?* Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2007. **362**(1484): p. 1257-1265.
238. Sun, Y., et al., *Islet 1 is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells*. Developmental Biology, 2007. **304**(1): p. 286-296.
239. Kattman, S.J., T.L. Huber, and G.M. Keller, *Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages*. Developmental Cell, 2006. **11**(5): p. 723-732.



240. Prall, O.W.J., et al., *An Nkx2-5/Bmp2/Smad1 negative feedback loop controls heart progenitor specification and proliferation*. Cell, 2007. **128**(5): p. 947-959.
241. Bertrand, N., et al., *Hox genes define distinct progenitor sub-domains within the second heart field*. Developmental Biology, 2011. **353**(2): p. 266-274.
242. Eloy-Trinquet, S. and J.-F. Nicolas, *Clonal separation and regionalisation during formation of the medial and lateral myotomes in the mouse embryo*. Development (Cambridge, England), 2002. **129**(1): p. 111-122.
243. Bajolle, F., et al., *Myocardium at the base of the aorta and pulmonary trunk is prefigured in the outflow tract of the heart and in subdomains of the second heart field*. Developmental Biology, 2008. **313**(1): p. 25-34.
244. Lescroart, F., et al., *Clonal analysis reveals common lineage relationships between head muscles and second heart field derivatives in the mouse embryo*. Development (Cambridge, England), 2010. **137**(19): p. 3269-3279.
245. Cai, C.-L., et al., *A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells*. Nature, 2008. **454**(7200): p. 104-8.
246. Gittenberger-de Groot, A.C., et al., *Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions*. Circ Res, 1998. **82**(10): p. 1043-1052.
247. Mikawa, T. and D.A. Fischman, *Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992. **89**(20): p. 9504-9508.
248. Mikawa, T. and R.G. Gourdie, *Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ*. Developmental Biology, 1996. **174**(2): p. 221-232.

249. Ratajska, A., E. Czarnowska, and B. Ciszek, *Embryonic development of the proepicardium and coronary vessels*. The International Journal of Developmental Biology, 2008. **52**(2-3): p. 229-36.
250. Männer, J., et al., *The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review*. Cells, Tissues, Organs, 2001. **169**(2): p. 89-103.
251. Dettman, R.W., et al., *Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart*. Developmental Biology, 1998. **193**(2): p. 169-181.
252. Männer, J., *Does the subepicardial mesenchyme contribute myocardioblasts to the myocardium of the chick embryo heart? A quail-chick chimera study tracing the fate of the epicardial primordium*. The Anatomical Record, 1999. **255**(2): p. 212-226.
253. Zhou, B., et al., *Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart*. Nature, 2008. **454**(7200): p. 109-13.
254. Zhou, B., et al., *Nkx2-5- and Isl1-expressing cardiac progenitors contribute to proepicardium*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008. **375**(3): p. 450-453.
255. Muñoz-Chápuli, R., et al., *Differentiation of hemangioblasts from embryonic mesothelial cells? A model on the origin of the vertebrate cardiovascular system*. Differentiation; Research in Biological Diversity, 1999. **64**(3): p. 133-41.
256. Muñoz-Chápuli, R., et al., *Cellular precursors of the coronary arteries*. Texas Heart Institute Journal, 2002. **29**(4): p. 243-249.
257. Virágh, S., et al., *Early development of quail heart epicardium and associated vascular and glandular structures*. Anatomy and Embryology, 1993. **188**(4): p. 381-393.

258. Tomanek, R.J., et al., *VEGF family members regulate myocardial tubulogenesis and coronary artery formation in the embryo*. Circ Res, 2006. **98**(7): p. 947-953.
259. Ratajska, A., et al., *Vasculogenesis of the embryonic heart: origin of blood island-like structures*. The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology, 2006. **288A**(3): p. 223-232.
260. Ratajska, A. and E. Czarnowska, *Vasculogenesis of the embryonic heart: contribution of nucleated red blood cells to early vascular structures*. Cardiovascular & Hematological Disorders Drug Targets, 2006. **6**(3): p. 219-25.
261. Bogers, A.J.J.C., et al., *Development of the origin of the coronary arteries, a matter of ingrowth or outgrowth?* Anatomy and Embryology, 1989. **180**(5): p. 437-441.
262. Bernanke, D.H. and J.M. Velkey, *Development of the coronary blood supply: changing concepts and current ideas*. The Anatomical Record, 2002. **269**(4): p. 198-208.
263. Tomanek, R.J., H.K. Hansen, and E.I. Dedkov, *Vascular patterning of the quail coronary system during development*. The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology, 2006. **288A**(9): p. 989-999.
264. Waldo, K.L., W. Willner, and M.L. Kirby, *Origin of the proximal coronary artery stems and a review of ventricular vascularization in the chick embryo*. The American Journal of Anatomy, 1990. **188**(2): p. 109-20.
265. Kattan, J., R.W. Dettman, and J. Bristow, *Formation and remodeling of the coronary vascular bed in the embryonic avian heart*. Developmental Dynamics, 2004. **230**(1): p. 34-43.

266. Hood, L.C. and T.H. Rosenquist, *Coronary artery development in the chick: origin and deployment of smooth muscle cells, and the effects of neural crest ablation*. The Anatomical Record, 1992. **234**(2): p. 291-300.
267. Ratajska, A., et al., *Differentiation of the smooth muscle cell phenotypes during embryonic development of coronary vessels in the rat*. Histochemistry and Cell Biology, 2001. **116**(1): p. 79-87.
268. Tomanek, R.J., *Formation of the coronary vasculature during development*. Angiogenesis, 2005. **8**(3): p. 273-284.
269. Kirby, M.L., K.L. Turnage, 3rd, and B.M. Hays, *Characterization of conotruncal malformations following ablation of "cardiac" neural crest*. The Anatomical Record, 1985. **213**(1): p. 87-93.
270. Conway, S.J., et al., *Development of a lethal congenital heart defect in the splotch (Pax3) mutant mouse*. Cardiovasc Res, 1997. **36**(2): p. 163-173.
271. Conway, S.J., et al., *Neural crest is involved in development of abnormal myocardial function*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1997. **29**(10): p. 2675-2685.
272. Waldo, K., et al., *Cardiac neural crest cells provide new insight into septation of the cardiac outflow tract: aortic sac to ventricular septal closure*. Developmental Biology, 1998. **196**(2): p. 129-144.
273. Poelmann, R.E., T. Mikawa, and A.C. Gittenberger-De Groot, *Neural crest cells in outflow tract septation of the embryonic chicken heart: differentiation and apoptosis*. Developmental Dynamics, 1998. **212**(3): p. 373-384.
274. Nishibatake, M., M.L. Kirby, and L.H. Van Mierop, *Pathogenesis of persistent truncus arteriosus and dextroposed aorta in the chick embryo after neural crest ablation*. Circulation, 1987. **75**(1): p. 255-264.

275. Besson, W.T., 3rd, et al., *Effects of the size of lesions of the cardiac neural crest at various embryonic ages on incidence and type of cardiac defects*. Circulation, 1986. **73**(2): p. 360-364.
276. Porras, D. and C.B. Brown, *Temporal-spatial ablation of neural crest in the mouse results in cardiovascular defects*. Developmental Dynamics, 2008. **237**(1): p. 153-162.
277. Conway, S.J., et al., *Decreased neural crest stem cell expansion is responsible for the conotruncal heart defects within the Splotch (Sp2H)/Pax3 mouse mutant*. Cardiovasc Res, 2000. **47**(2): p. 314-328.
278. Mjaatvedt, C.H., et al., *Normal distribution of melanocytes in the mouse heart*. The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology, 2005. **285A**(2): p. 748-757.
279. Pietri, T., et al., *The human tissue plasminogen activator-Cre mouse: a new tool for targeting specifically neural crest cells and their derivatives in vivo*. Developmental Biology, 2003. **259**(1): p. 176-187.
280. Verberne, M.E., et al., *Distribution of different regions of cardiac neural crest in the extrinsic and the intrinsic cardiac nervous system*. Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists, 2000. **217**(2): p. 191-204.
281. Poelmann, R.E., et al., *The neural crest is contiguous with the cardiac conduction system in the mouse embryo: a role in induction?* Anatomy and Embryology, 2004. **208**(5): p. 389-93.
282. Martinsen, B.J., et al., *Cardiac neural crest ablation alters Id2 gene expression in the developing heart*. Developmental Biology, 2004. **272**(1): p. 176-190.

283. Bradshaw, L., et al., *Dual role for neural crest cells during outflow tract septation in the neural crest-deficient mutant Splotch(2H)*. Journal of Anatomy, 2009. **214**(2): p. 245-257.
284. Waldo, K.L., et al., *Cardiac neural crest is necessary for normal addition of the myocardium to the arterial pole from the secondary heart field*. Developmental Biology, 2005. **281**(1): p. 66-77.
285. Yelbuz, T.M., et al., *Shortened outflow tract leads to altered cardiac looping after neural crest ablation*. Circulation, 2002. **106**(4): p. 504-510.
286. Waldo, K.L., et al., *Secondary heart field contributes myocardium and smooth muscle to the arterial pole of the developing heart*. Developmental Biology, 2005. **281**(1): p. 78-90.
287. Yelbuz, T.M., et al., *Myocardial volume and organization are changed by failure of addition of secondary heart field myocardium to the cardiac outflow tract*. Developmental Dynamics, 2003. **228**(2): p. 152-160.
288. Waldo, K., et al., *A novel role for cardiac neural crest in heart development*. The Journal of Clinical Investigation, 1999. **103**(11): p. 1499-507.
289. Morikawa, Y. and P. Cserjesi, *Cardiac neural crest expression of Hand2 regulates outflow and second heart field development*. Circulation Research, 2008. **103**(12): p. 1422-9.
290. Linask, K.K. and J.W. Lash, *Early heart development: dynamics of endocardial cell sorting suggests a common origin with cardiomyocytes*. Developmental Dynamics, 1993. **196**(1): p. 62-69.
291. Eisenberg, C.A. and R.R. Markwald, *Mixed cultures of avian blastoderm cells and the quail mesoderm cell line QCE-6 provide evidence for the pluripotentiality of early mesoderm*. Developmental Biology, 1997. **191**(2): p. 167-181.

- 292. Pardanaud, L., et al., *Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells*. Development, 1987. **100**(2): p. 339-349.
- 293. Linask, K.K. and J.W. Lash, *Precardiac cell migration: fibronectin localization at mesoderm-endoderm interface during directional movement*. Developmental Biology, 1986. **114**(1): p. 87-101.
- 294. Virágh, S., E. Szabó, and C.E. Challice, *Formation of the primitive myo- and endocardial tubes in the chicken embryo*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1989. **21**(2): p. 123-137.
- 295. Crossin, K.L., et al., *Site-restricted expression of cytotactin during development of the chicken embryo*. J. Cell Biol., 1986. **102**(5): p. 1917-1930.
- 296. Wunsch, A.M., C.D. Little, and R.R. Markwald, *Cardiac endothelial heterogeneity defines valvular development as demonstrated by the diverse expression of JB3, an antigen of the endocardial cushion tissue*. Developmental Biology, 1994. **165**(2): p. 585-601.
- 297. Linask, K.K. and J.W. Lash, *A role for fibronectin in the migration of avian precardiac cells : I. Dose-dependent effects of fibronectin antibody*. Developmental Biology, 1988. **129**(2): p. 315-323.
- 298. Coffin, J.D. and T.J. Poole, *Endothelial cell origin and migration in embryonic heart and cranial blood vessel development*. The Anatomical Record, 1991. **231**(3): p. 383-95.
- 299. Wei, Y. and T. Mikawa, *Fate diversity of primitive streak cells during heart field formation in ovo*. Developmental Dynamics, 2000. **219**(4): p. 505-513.

300. Cohen-Gould, L. and T. Mikawa, *The fate diversity of mesodermal cells within the heart field during chicken early embryogenesis*. Developmental Biology, 1996. **177**(1): p. 265-273.
301. Eisenberg, L.M. and R.R. Markwald, *Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis*. Circ Res, 1995. **77**(1): p. 1-6.
302. Brutsaert, D.L., *Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity*. Physiol. Rev., 2003. **83**(1): p. 59-115.
303. Manasek, F.J., *Embryonic development of the heart. I. A light and electron microscopic study of myocardial development in the early chick embryo*. Journal of Morphology, 1968. **125**(3): p. 329-365.
304. Linask, K.K., *Regulation of heart morphology: current molecular and cellular perspectives on the coordinated emergence of cardiac form and function*. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, 2003. **69**(1): p. 14-24.
305. Navaratnam, V., et al., *Differentiation of the myocardial rudiment of mouse embryos: an ultrastructural study including freeze-fracture replication*. Journal of Anatomy, 1986. **146**: p. 65-85.
306. Tokuyasu, K.T., *Immunocytochemical studies of cardiac myofibrillogenesis in early chick embryos. III. Generation of fasciae adherentes and costameres*. J. Cell Biol., 1989. **108**(1): p. 43-53.
307. Tokuyasu, K.T. and P.A. Maher, *Immunocytochemical studies of cardiac myofibrillogenesis in early chick embryos. II. Generation of alpha-actinin dots within titin spots at the time of the first myofibril formation*. J. Cell Biol., 1987. **105**(6): p. 2795-2801.



308. Tokuyasu, K.T. and P.A. Maher, *Immunocytochemical studies of cardiac myofibrillogenesis in early chick embryos. I. Presence of immunofluorescent titin spots in premyofibril stages*. J. Cell Biol., 1987. **105**(6): p. 2781-2793.
309. Hirota, A., et al., *Mapping of early development of electrical activity in the embryonic chick heart using multiple-site optical recording*. J Physiol, 1987. **383**(1): p. 711-728.
310. Kamino, K., *Optical approaches to ontogeny of electrical activity and related functional organization during early heart development*. Physiol. Rev., 1991. **71**(1): p. 53-91.
311. Nishii, K. and Y. Shibata, *Mode and determination of the initial contraction stage in the mouse embryo heart*. Anatomy and Embryology, 2006. **211**(2): p. 95-100.
312. Shiraishi, I., et al., *3-D observation of actin filaments during cardiac myofibrinogenesis in chick embryo using a confocal laser scanning microscope*. Anatomy and Embryology, 1992. **185**(4): p. 401-408.
313. Shiraishi, I., T. Takamatsu, and S. Fujita, *Three-dimensional observation with a confocal scanning laser microscope of fibronectin immunolabeling during cardiac looping in the chick embryo*. Anatomy and Embryology, 1995. **191**(3): p. 183-189.
314. Hirota, A., et al., *Early events in development of electrical activity and contraction in embryonic rat heart assessed by optical recording*. J Physiol, 1985. **369**(1): p. 209-227.
315. McGrath, K.E., et al., *Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo*. Blood, 2003. **101**(5): p. 1669-1675.

- 316. Virágh, S. and C.E. Challice, *The development of the conduction system in the mouse embryo heart : I. The first embryonic A-V conduction pathway*. Developmental Biology, 1977. **56**(2): p. 382-396.
- 317. Rentschler, S., et al., *Visualization and functional characterization of the developing murine cardiac conduction system*. Development, 2001. **128**(10): p. 1785-1792.
- 318. Rentschler, S., et al., *Neuregulin-1 promotes formation of the murine cardiac conduction system*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(16): p. 10464-10469.
- 319. Camenisch, T.D., et al., *Temporal and distinct TGFbeta ligand requirements during mouse and avian endocardial cushion morphogenesis*. Developmental Biology, 2002. **248**(1): p. 170-181.
- 320. Bernanke, D.H. and R.R. Markwald, *Migratory behavior of cardiac cushion tissue cells in a collagen-lattice culture system*. Developmental Biology, 1982. **91**(2): p. 235-245.
- 321. Mjaatvedt, C.H. and R.R. Markwald, *Induction of an epithelial-mesenchymal transition by an in vivo adheron-like complex*. Developmental Biology, 1989. **136**(1): p. 118-128.
- 322. Rezaee, M., et al., *Identification of an extracellular 130-kDa protein involved in early cardiac morphogenesis*. J. Biol. Chem., 1993. **268**(19): p. 14404-14411.
- 323. Krug, E.L., R.B. Runyan, and R.R. Markwald, *Protein extracts from early embryonic hearts initiate cardiac endothelial cytodifferentiation*. Developmental Biology, 1985. **112**(2): p. 414-426.

- 324. Markwald, R.R., T.P. Fitzharris, and W.N.A. Smith, *Structural analysis of endocardial cytodifferentiation*. Developmental Biology, 1975. **42**(1): p. 160-180.
- 325. Markwald, R.R., T.P. Fitzharris, and F.J. Manasek, *Structural development of endocardial cushions*. The American Journal of Anatomy, 1977. **148**(1): p. 85-119.
- 326. Runyan, R.B. and R.R. Markwald, *Invasion of mesenchyme into three-dimensional collagen gels: a regional and temporal analysis of interaction in embryonic heart tissue*. Developmental Biology, 1983. **95**(1): p. 108-114.
- 327. Mjaatvedt, C.H., R.C. Lepera, and R.R. Markwald, *Myocardial specificity for initiating endothelial-mesenchymal cell transition in embryonic chick heart correlates with a particulate distribution of fibronectin*. Developmental Biology, 1987. **119**(1): p. 59-67.
- 328. Krug, E.L., C.H. Mjaatvedt, and R.R. Markwald, *Extracellular matrix from embryonic myocardium elicits an early morphogenetic event in cardiac endothelial differentiation*. Developmental Biology, 1987. **120**(2): p. 348-355.
- 329. Timmerman, L.A., et al., *Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation*. Genes & Development, 2004. **18**(1): p. 99-115.
- 330. Garg, V., et al., *Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease*. Nature, 2005. **437**(7056): p. 270-274.
- 331. Li, L., et al., *Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1*. Nat Genet, 1997. **16**(3): p. 243-251.
- 332. Oda, T., et al., *Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome*. Nat Genet, 1997. **16**(3): p. 235-242.

- 333. Eldadah, Z.A., et al., *Familial Tetralogy of Fallot caused by mutation in the jagged1 gene*. Hum. Mol. Genet., 2001. **10**(2): p. 163-169.
- 334. Donovan, J., et al., *Tetralogy of fallot and other congenital heart defects in Hey2 mutant mice*. Current Biology, 2002. **12**(18): p. 1605-1610.
- 335. Fischer, A., et al., *The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development*. Genes & Development, 2004. **18**(8): p. 901-11.
- 336. Fischer, A., et al., *Combined loss of Hey1 and HeyL causes congenital heart defects because of impaired epithelial to mesenchymal transition*. Circ Res, 2007. **100**(6): p. 856-863.
- 337. Niessen, K., et al., *Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization*. J. Cell Biol., 2008. **182**(2): p. 315-325.
- 338. Boyer, A.S., et al., *TGFbeta2 and TGFbeta3 have separate and sequential activities during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart*. Developmental Biology, 1999. **208**(2): p. 530-545.
- 339. Sanford, L.P., et al., *TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes*. Development, 1997. **124**(13): p. 2659-2670.
- 340. Bartram, U., et al., *Double-outlet right ventricle and overriding tricuspid valve reflect disturbances of looping, myocardialization, endocardial cushion differentiation, and apoptosis in TGF-beta(2)-knockout mice*. Circulation, 2001. **103**(22): p. 2745-2752.
- 341. Molin, D.G.M., et al., *Expression patterns of Tgfbeta1-3 associate with myocardialisation of the outflow tract and the development of the epicardium and the fibrous heart skeleton*. Developmental Dynamics, 2003. **227**(3): p. 431-444.

- 342. Shull, M.M., et al., *Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease*. *Nature*, 1992. **359**(6397): p. 693-699.
- 343. Letterio, J.J., et al., *Maternal rescue of transforming growth factor-beta 1 null mice*. *Science (New York, N.Y.)*, 1994. **264**(5167): p. 1936-1938.
- 344. Proetzel, G., et al., *Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion*. *Nat Genet*, 1995. **11**(4): p. 409-414.
- 345. Kaartinen, V., et al., *Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction*. *Nat Genet*, 1995. **11**(4): p. 415-421.
- 346. Nakajima, Y., et al., *Extracellular fibrillar structure of latent TGF beta binding protein-1: role in TGF beta-dependent endothelial-mesenchymal transformation during endocardial cushion tissue formation in mouse embryonic heart*. *J. Cell Biol.*, 1997. **136**(1): p. 193-204.
- 347. Jiao, K., et al., *Tgfbeta signaling is required for atrioventricular cushion mesenchyme remodeling during in vivo cardiac development*. *Development*, 2006. **133**(22): p. 4585-4593.
- 348. Stenvers, K.L., et al., *Heart and liver defects and reduced transforming growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos*. *Mol. Cell. Biol.*, 2003. **23**(12): p. 4371-4385.
- 349. Bourdeau, A., D.J. Dumont, and M. Letarte, *A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia*. *The Journal of Clinical Investigation*, 1999. **104**(10): p. 1343-1351.
- 350. Liao, W., et al., *The zebrafish gene cloche acts upstream of a flk-1 homologue to regulate endothelial cell differentiation*. *Development*, 1997. **124**(2): p. 381-389.

- 351. Stainier, D.Y., et al., *Cloche, an early acting zebrafish gene, is required by both the endothelial and hematopoietic lineages*. Development, 1995. **121**(10): p. 3141-3150.
- 352. Miquerol, L., et al., *Multiple developmental roles of VEGF suggested by a LacZ-tagged allele*. Developmental Biology, 1999. **212**(2): p. 307-322.
- 353. Sugishita, Y., et al., *Expression of genes encoding vascular endothelial growth factor and its Flk-1 receptor in the chick embryonic heart*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2000. **32**(6): p. 1039-1051.
- 354. Carmeliet, P., et al., *Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 435-439.
- 355. Ferrara, N., et al., *Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 439-442.
- 356. Haigh, J.J., et al., *Conditional inactivation of VEGF-A in areas of collagen2a1 expression results in embryonic lethality in the heterozygous state*. Development, 2000. **127**(7): p. 1445-1453.
- 357. Miquerol, L., B.L. Langille, and A. Nagy, *Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression*. Development, 2000. **127**(18): p. 3941-3946.
- 358. Puri, M.C., et al., *Interaction of the TEK and TIE receptor tyrosine kinases during cardiovascular development*. Development, 1999. **126**(20): p. 4569-4580.
- 359. Sato, T.N., et al., *Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation*. Nature, 1995. **376**(6535): p. 70-74.
- 360. Suri, C., et al., *Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1171-1180.

- 361. Maisonpierre, P.C., et al., *Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis*. Science, 1997. **277**(5322): p. 55-60.
- 362. Gassmann, M., et al., *Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor*. Nature, 1995. **378**(6555): p. 390-394.
- 363. Kramer, R., et al., *Neuregulins with an Ig-like domain are essential for mouse myocardial and neuronal development*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(10): p. 4833-8.
- 364. Lee, K.-F., et al., *Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development*. Nature, 1995. **378**(6555): p. 394-398.
- 365. Marchionni, M.A., *Neu tack on neuregulin*. Nature, 1995. **378**(6555): p. 334-335.
- 366. Meyer, D. and C. Birchmeier, *Multiple essential functions of neuregulin in development*. Nature, 1995. **378**(6555): p. 386-390.
- 367. Zhao, J.J. and G. Lemke, *Selective disruption of neuregulin-1 function in vertebrate embryos using ribozyme-tRNA transgenes*. Development, 1998. **125**(10): p. 1899-1907.
- 368. Nebigil, C.G., et al., *Serotonin 2B receptor is required for heart development*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(17): p. 9508-9513.
- 369. Nebigil, C.G. and L. Maroteaux, *A novel role for serotonin in heart*. Trends in Cardiovascular Medicine, 2001. **11**(8): p. 329-335.
- 370. Nebigil, C.G., et al., *Ablation of serotonin 5-HT(2B) receptors in mice leads to abnormal cardiac structure and function*. Circulation, 2001. **103**(24): p. 2973-2979.

- 371. Sedmera, D., et al., *Developmental patterning of the myocardium*. The Anatomical Record, 2000. **258**(4): p. 319-337.
- 372. Sedmera, D. and T. McQuinn, *Embryogenesis of the heart muscle*. Heart Failure Clinics, 2008. **4**(3): p. 235-245.
- 373. Franco, D., W.H. Lamers, and A.F.M. Moorman, *Patterns of expression in the developing myocardium: towards a morphologically integrated transcriptional model*. Cardiovasc Res, 1998. **38**(1): p. 25-53.
- 374. Hertig, C.M., et al., *Synergistic roles of neuregulin-1 and insulin-like growth factor-I in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway and cardiac chamber morphogenesis*. J. Biol. Chem., 1999. **274**(52): p. 37362-37369.
- 375. Buja, L.M. and D. Vela, *Cardiomyocyte death and renewal in the normal and diseased heart*. Cardiovascular Pathology, 2008. **17**(6): p. 349-374.
- 376. Franco, D., et al., *Multiple transcriptional domains, with distinct left and right components, in the atrial chambers of the developing heart*. Circ Res, 2000. **87**(11): p. 984-991.
- 377. Nichols, K.E., et al., *Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1*. Nat Genet, 2000. **24**(3): p. 266-270.
- 378. Van Esch, H., et al., *GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome*. Nature, 2000. **406**(6794): p. 419-422.
- 379. Garg, V., et al., *GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5*. Nature, 2003. **424**(6947): p. 443-447.



380. Rajagopal, S.K., et al., *Spectrum of heart disease associated with murine and human GATA4 mutation*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2007. **43**(6): p. 677-685.
381. Brewer, A. and J. Pizzey, *GATA factors in vertebrate heart development and disease*. Expert Reviews in Molecular Medicine, 2006. **8**(22): p. 1-20.
382. Molkentin, J.D., et al., *Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis*. Genes & Development, 1997. **11**(8): p. 1061-72.
383. Kuo, C.T., et al., *GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation*. Genes & Development, 1997. **11**(8): p. 1048-60.
384. Zeisberg, E.M., et al., *Morphogenesis of the right ventricle requires myocardial expression of Gata4*. The Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(6): p. 1522-31.
385. Pu, W.T., et al., *GATA4 is a dosage-sensitive regulator of cardiac morphogenesis*. Developmental Biology, 2004. **275**(1): p. 235-244.
386. Oka, T., et al., *Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability*. Circ Res, 2006. **98**(6): p. 837-845.
387. Bodmer, R., *The gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in Drosophila*. Development (Cambridge, England), 1993. **118**(3): p. 719-729.
388. Lyons, I., et al., *Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5*. Genes & Development, 1995. **9**(13): p. 1654-1666.

- 389. Tanaka, M., et al., *The cardiac homeobox gene Csx/Nkx2.5 lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development*. Development, 1999. **126**(6): p. 1269-1280.
- 390. Biben, C., et al., *Cardiac septal and valvular dysmorphogenesis in mice heterozygous for mutations in the homeobox gene Nkx2-5*. Circ Res, 2000. **87**(10): p. 888-895.
- 391. Tanaka, M., et al., *A mouse model of congenital heart disease: cardiac arrhythmias and atrial septal defect caused by haploinsufficiency of the cardiac transcription factor Csx/Nkx2.5*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 2002. **67**: p. 317-325.
- 392. Winston, J.B., et al., *Heterogeneity of genetic modifiers ensures normal cardiac development*. Circulation, 2010. **121**(11): p. 1313-1321.
- 393. Schott, J.-J., et al., *Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5*. Science, 1998. **281**(5373): p. 108-111.
- 394. Benson, D.W., et al., *Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways*. The Journal of Clinical Investigation, 1999. **104**(11): p. 1567-73.
- 395. Elliott, D.A., et al., *Cardiac homeobox gene NKX2-5 mutations and congenital heart disease: associations with atrial septal defect and hypoplastic left heart syndrome*. Journal of the American College of Cardiology, 2003. **41**(11): p. 2072-2076.
- 396. Reamon-Buettner, S.M. and J. Borlak, *Somatic NKX2-5 mutations as a novel mechanism of disease in complex congenital heart disease*. J Med Genet, 2004. **41**(9): p. 684-690.

397. Inga, A., et al., *Functional dissection of sequence-specific NKX2-5 DNA binding domain mutations associated with human heart septation defects using a yeast-based system*. Hum. Mol. Genet., 2005. **14**(14): p. 1965-1975.
398. Gutierrez-Roelens, I., et al., *A novel CSX//NKX2-5 mutation causes autosomal-dominant AV block: are atrial fibrillation and syncopes part of the phenotype?* Eur J Hum Genet, 2006. **14**(12): p. 1313-1316.
399. Rauch, R., et al., *Comprehensive genotype-phenotype analysis in 230 patients with tetralogy of Fallot*. Journal of Medical Genetics, 2010. **47**(5): p. 321-331.
400. Akazawa, H. and I. Komuro, *Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: Its role in cardiac development and diseases*. Pharmacology & Therapeutics, 2005. **107**(2): p. 252-268.
401. Moskowitz, I.P.G., et al., *A molecular pathway including Id2, Tbx5, and Nkx2-5 required for cardiac conduction system development*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1365-76.
402. Jay, P.Y., et al., *Nkx2-5 mutation causes anatomic hypoplasia of the cardiac conduction system*. The Journal of Clinical Investigation, 2004. **113**(8): p. 1130-7.
403. Pashmforoush, M., et al., *Nkx2-5 pathways and congenital heart disease; loss of ventricular myocyte lineage specification leads to progressive cardiomyopathy and complete heart block*. Cell, 2004. **117**(3): p. 373-386.
404. Wardle, F.C. and V.E. Papaioannou, *Teasing out T-box targets in early mesoderm*. Current Opinion in Genetics & Development, 2008. **18**(5): p. 418-425.

- 405. Chapman, D.L., et al., *Tbx6, a mouse T-Box gene implicated in paraxial mesoderm formation at gastrulation*. Developmental Biology, 1996. **180**(2): p. 534-542.
- 406. Chapman, D.L. and V.E. Papaioannou, *Three neural tubes in mouse embryos with mutations in the T-box gene Tbx6*. Nature, 1998. **391**(6668): p. 695-697.
- 407. White, P.H., et al., *Defective somite patterning in mouse embryos with reduced levels of Tbx6*. Development (Cambridge, England), 2003. **130**(8): p. 1681-1690.
- 408. Watabe-Rudolph, M., et al., *The mouse rib-vertebrae mutation is a hypomorphic Tbx6 allele*. Mechanisms of Development, 2002. **119**(2): p. 251-256.
- 409. Chapman, D.L., et al., *Critical role for Tbx6 in mesoderm specification in the mouse embryo*. Mechanisms of Development, 2003. **120**(7): p. 837-847.
- 410. Stennard, F.A. and R.P. Harvey, *T-box transcription factors and their roles in regulatory hierarchies in the developing heart*. Development, 2005. **132**(22): p. 4897-4910.
- 411. Chapman, D.L., et al., *Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development*. Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists, 1996. **206**(4): p. 379-390.
- 412. Yamagishi, H., et al., *Tbx1 is regulated by tissue-specific forkhead proteins through a common Sonic hedgehog-responsive enhancer*. Genes & Development, 2003. **17**(2): p. 269-81.

- 413. Zhang, Z., et al., *Tbx1 expression in pharyngeal epithelia is necessary for pharyngeal arch artery development*. Development (Cambridge, England), 2005. **132**(23): p. 5307-5315.
- 414. Parisot, P., et al., *Tbx1, subpulmonary myocardium and conotruncal congenital heart defects*. Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology, 2011. **91**(6): p. 477-484.
- 415. Tézenas Du Montcel, S., et al., *Prevalence of 22q11 microdeletion*. Journal of Medical Genetics, 1996. **33**(8): p. 719-719.
- 416. Scambler, P.J., *The 22q11 deletion syndromes*. Human Molecular Genetics, 2000. **9**(16): p. 2421-2426.
- 417. Baldini, A., *Dissecting contiguous gene defects: TBX1*. Current Opinion in Genetics & Development, 2005. **15**(3): p. 279-284.
- 418. Paylor, R., et al., *Tbx1 haploinsufficiency is linked to behavioral disorders in mice and humans: implications for 22q11 deletion syndrome*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(20): p. 7729-7734.
- 419. Ryan, A.K., et al., *Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study*. Journal of Medical Genetics, 1997. **34**(10): p. 798-804.
- 420. Liao, J., et al., *Full spectrum of malformations in velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge syndrome mouse models by altering Tbx1 dosage*. Hum. Mol. Genet., 2004. **13**(15): p. 1577-1585.
- 421. Shprintzen, R.J., *Velo-cardio-facial syndrome: 30 Years of study*. Developmental Disabilities Research Reviews, 2008. **14**(1): p. 3-10.

- 422. Yagi, H., et al., *Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome*. Lancet, 2003. **362**(9393): p. 1366-1373.
- 423. Stoller, J.Z. and J.A. Epstein, *Identification of a novel nuclear localization signal in Tbx1 that is deleted in DiGeorge syndrome patients harboring the 1223delC mutation*. Human Molecular Genetics, 2005. **14**(7): p. 885-892.
- 424. Zweier, C., et al., *Human TBX1 missense mutations cause gain of function resulting in the same phenotype as 22q11.2 deletions*. American Journal of Human Genetics, 2007. **80**(3): p. 510-517.
- 425. Torres-Juan, L., et al., *Mutations in TBX1 genocopy the 22q11.2 deletion and duplication syndromes: a new susceptibility factor for mental retardation*. European Journal of Human Genetics: EJHG, 2007. **15**(6): p. 658-663.
- 426. Xu, H., F. Cerrato, and A. Baldini, *Timed mutation and cell-fate mapping reveal reiterated roles of Tbx1 during embryogenesis, and a crucial function during segmentation of the pharyngeal system via regulation of endoderm expansion*. Development (Cambridge, England), 2005. **132**(19): p. 4387-4395.
- 427. Maeda, J., et al., *Tbx1 is regulated by forkhead proteins in the secondary heart field*. Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists, 2006. **235**(3): p. 701-710.
- 428. Chen, L., et al., *Tbx1 regulates proliferation and differentiation of multipotent heart progenitors*. Circulation Research, 2009. **105**(9): p. 842-851.
- 429. Fulcoli, F.G., et al., *Tbx1 regulates the BMP-Smad1 pathway in a transcription independent manner*. PloS One, 2009. **4**(6): p. e6049-e6049.

430. Vitelli, F., et al., *Tbx1 mutation causes multiple cardiovascular defects and disrupts neural crest and cranial nerve migratory pathways*. Hum. Mol. Genet., 2002. **11**(8): p. 915-922.
431. Calmont, A., et al., *Tbx1 controls cardiac neural crest cell migration during arch artery development by regulating Gbx2 expression in the pharyngeal ectoderm*. Development (Cambridge, England), 2009. **136**(18): p. 3173-3183.
432. Taddei, I., et al., *Genetic factors are major determinants of phenotypic variability in a mouse model of the DiGeorge/del22q11 syndromes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(20): p. 11428-11431.
433. Zhang, Z. and A. Baldini, *In vivo response to high-resolution variation of Tbx1 mRNA dosage*. Human Molecular Genetics, 2008. **17**(1): p. 150-157.
434. Carelle-Calmels, N., et al., *Genetic compensation in a human genomic disorder*. The New England Journal of Medicine, 2009. **360**(12): p. 1211-1216.
435. Alkalay, A.A., et al., *Genetic dosage compensation in a family with velo-cardio-facial/DiGeorge/22q11.2 deletion syndrome*. American Journal of Medical Genetics. Part A, 2011. **155A**(3): p. 548-554.
436. Christoffels, V.M., et al., *T-box transcription factor Tbx2 represses differentiation and formation of the cardiac chambers*. Developmental Dynamics, 2004. **229**(4): p. 763-770.
437. Habets, P.E.M.H., et al., *Cooperative action of Tbx2 and Nkx2.5 inhibits ANF expression in the atrioventricular canal: implications for cardiac chamber formation*. Genes & Development, 2002. **16**(10): p. 1234-1246.

438. Harrelson, Z., et al., *Tbx2 is essential for patterning the atrioventricular canal and for morphogenesis of the outflow tract during heart development*. Development, 2004. **131**(20): p. 5041-5052.
439. Ribeiro, I., et al., *Tbx2 and Tbx3 regulate the dynamics of cell proliferation during heart remodeling*. PloS One, 2007. **2**(4): p. e398-e398.
440. Rutenberg, J.B., et al., *Developmental patterning of the cardiac atrioventricular canal by Notch and Hairy-related transcription factors*. Development, 2006. **133**(21): p. 4381-4390.
441. Kokubo, H., et al., *Hesr1 and Hesr2 regulate atrioventricular boundary formation in the developing heart through the repression of Tbx2*. Development, 2007. **134**(4): p. 747-755.
442. Chi, N.C., et al., *Foxn4 directly regulates tbx2b expression and atrioventricular canal formation*. Genes & Development, 2008. **22**(6): p. 734-9.
443. Wakker, V., et al., *Generation of mice with a conditional null allele for Tbx2*. Genesis (New York, N.Y.: 2000), 2010. **48**(3): p. 195-199.
444. Aanhaanen, W.T.J., et al., *Defective Tbx2-dependent patterning of the atrioventricular canal myocardium causes accessory pathway formation in mice*. The Journal of Clinical Investigation, 2011. **121**(2): p. 534-544.
445. Verhoeven, M.C., et al., *Wnt signaling regulates atrioventricular canal formation upstream of BMP and Tbx2*. Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology, 2011. **91**(6): p. 435-440.
446. Ballif, B.C., et al., *Identification of a recurrent microdeletion at 17q23.1q23.2 flanked by segmental duplications associated with heart defects and limb abnormalities*. American Journal of Human Genetics, 2010. **86**(3): p. 454-461.



- 447. Radio, F.C., et al., *TBX2 gene duplication associated with complex heart defect and skeletal malformations*. American Journal of Medical Genetics. Part A, 2010. **152A**(8): p. 2061-2066.
- 448. Singh, R., et al., *Tbx20 interacts with smads to confine tbx2 expression to the atrioventricular canal*. Circulation Research, 2009. **105**(5): p. 442-452.
- 449. Aanhaanen, W.T.J., et al., *Developmental origin, growth, and three-dimensional architecture of the atrioventricular conduction axis of the mouse heart*. Circulation Research, 2010. **107**(6): p. 728-736.
- 450. Dupays, L., et al., *Tbx2 misexpression impairs deployment of second heart field derived progenitor cells to the arterial pole of the embryonic heart*. Developmental Biology, 2009. **333**(1): p. 121-131.
- 451. Bamshad, M., et al., *Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome*. Nature Genetics, 1997. **16**(3): p. 311-315.
- 452. Bamshad, M., et al., *The spectrum of mutations in TBX3: Genotype/Phenotype relationship in Ulnar-Mammary syndrome*. The American Journal of Human Genetics, 1999. **64**(6): p. 1550-1562.
- 453. Davenport, T.G., L.A. Jerome-Majewska, and V.E. Papaioannou, *Mammary gland, limb and yolk sac defects in mice lacking Tbx3, the gene mutated in human ulnar mammary syndrome*. Development (Cambridge, England), 2003. **130**(10): p. 2263-2273.
- 454. Hoogaars, W.M.H., et al., *Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria*. Genes & Development, 2007. **21**(9): p. 1098-1112.

- 455. Bakker, M.L., et al., *Transcription factor Tbx3 is required for the specification of the atrioventricular conduction system*. Circulation Research, 2008. **102**(11): p. 1340-9.
- 456. Wiese, C., et al., *Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3*. Circulation Research, 2009. **104**(3): p. 388-97.
- 457. Mesbah, K., et al., *Tbx3 is required for outflow tract development*. Circulation Research, 2008. **103**(7): p. 743-50.
- 458. Meneghini, V., et al., *Novel TBX3 mutation data in families with Ulnar-Mammary syndrome indicate a genotype-phenotype relationship: mutations that do not disrupt the T-domain are associated with less severe limb defects*. European Journal of Medical Genetics, 2006. **49**(2): p. 151-158.
- 459. Linden, H., et al., *Ulnar Mammary syndrome and TBX3: expanding the phenotype*. American Journal of Medical Genetics. Part A, 2009. **149A**(12): p. 2809-2812.
- 460. Carlson, H., et al., *Tbx3 impinges on the p53 pathway to suppress apoptosis, facilitate cell transformation and block myogenic differentiation*. Oncogene, 2002. **21**(24): p. 3827-3835.
- 461. Hoogaars, W.M.H., et al., *The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart*. Cardiovasc Res, 2004. **62**(3): p. 489-499.
- 462. Mommersteeg, M.T.M., et al., *Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node*. Circ Res, 2007. **100**(3): p. 354-362.
- 463. Horsthuis, T., et al., *Gene expression profiling of the forming atrioventricular node using a novel tbx3-based node-specific transgenic reporter*. Circulation Research, 2009. **105**(1): p. 61-69.

- 464. Pfeufer, A., et al., *Genome-wide association study of PR interval*. Nature Genetics, 2010. **42**(2): p. 153-159.
- 465. Bussen, M., et al., *The T-box transcription factor Tbx18 maintains the separation of anterior and posterior somite compartments*. Genes & Development, 2004. **18**(10): p. 1209-1221.
- 466. Airik, R., et al., *Tbx18 regulates the development of the ureteral mesenchyme*. The Journal of Clinical Investigation, 2006. **116**(3): p. 663-674.
- 467. Christoffels, V.M., et al., *Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18*. Circ Res, 2006. **98**(12): p. 1555-1563.
- 468. van Wijk, B., et al., *Epicardium and myocardium separate from a common precursor pool by crosstalk between bone morphogenetic protein- and fibroblast growth factor-signaling pathways*. Circulation Research, 2009. **105**(5): p. 431-441.
- 469. van Wijk, B. and M. van den Hoff, *Epicardium and myocardium originate from a common cardiogenic precursor pool*. Trends in Cardiovascular Medicine, 2010. **20**(1): p. 1-7.
- 470. Mommersteeg, M.T.M., et al., *The sinus venosus progenitors separate and diversify from the first and second heart fields early in development*. Cardiovascular Research, 2010. **87**(1): p. 92-101.
- 471. Niedrist, D., I.W. Lurie, and A. Schinzel, *4q32-q35 and 6q16-q22 are valuable candidate regions for split hand/foot malformation*. European Journal of Human Genetics: EJHG, 2009. **17**(8): p. 1086-1091.

- 472. Meins, M., et al., *Characterization of the human TBX20 gene, a new member of the T-Box gene family closely related to the Drosophila H15 gene*. Genomics, 2000. **67**(3): p. 317-332.
- 473. Carson, C.T., E.R. Kinzler, and B.A. Parr, *Tbx12, a novel T-box gene, is expressed during early stages of heart and retinal development*. Mechanisms of Development, 2000. **96**(1): p. 137-140.
- 474. Stennard, F.A., et al., *Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2-5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart*. Developmental Biology, 2003. **262**(2): p. 206-224.
- 475. Hoogaars, W.M.H., et al., *T-box factors determine cardiac design*. Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS, 2007. **64**(6): p. 646-60.
- 476. Shelton, E.L. and K.E. Yutzey, *Tbx20 regulation of endocardial cushion cell proliferation and extracellular matrix gene expression*. Developmental Biology, 2007. **302**(2): p. 376-388.
- 477. Kirk, E.P., et al., *Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy*. The American Journal of Human Genetics, 2007. **81**(2): p. 280-291.
- 478. Liu, C., et al., *T-box transcription factor TBX20 mutations in Chinese patients with congenital heart disease*. European Journal of Medical Genetics, 2008. **51**(6): p. 580-587.
- 479. Posch, M.G., et al., *A gain-of-function TBX20 mutation causes congenital atrial septal defects, patent foramen ovale and cardiac valve defects*. Journal of Medical Genetics, 2010. **47**(4): p. 230-235.

- 480. Liberatore, C.M., R.D. Searcy-Schrick, and K.E. Yutzey, *Ventricular expression of tbx5 inhibits normal heart chamber development*. Developmental Biology, 2000. **223**(1): p. 169-180.
- 481. Bruneau, B.G., et al., *A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease*. Cell, 2001. **106**(6): p. 709-721.
- 482. Hiroi, Y., et al., *Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation*. Nat Genet, 2001. **28**(3): p. 276-280.
- 483. Fijnvandraat, A.C., et al., *TBX5 overexpression stimulates differentiation of chamber myocardium in P19Cl6 embryonic carcinoma cells*. Journal of Muscle Research and Cell Motility, 2003. **24**(2): p. 211-218.
- 484. Plageman, T.F., Jr. and K.E. Yutzey, *Microarray analysis of Tbx5-induced genes expressed in the developing heart*. Developmental Dynamics, 2006. **235**(10): p. 2868-2880.
- 485. Ding, B., et al., *p204 is required for the differentiation of P19 murine embryonal carcinoma cells to beating cardiac myocytes: its expression is activated by the cardiac Gata4, Nkx2.5, and Tbx5 proteins*. The Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(21): p. 14882-14892.
- 486. Chen, H., et al., *Common marmoset embryonic stem cell can differentiate into cardiomyocytes*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008. **369**(3): p. 801-806.
- 487. Lu, J.H., et al., *Cascade effect of cardiac myogenesis gene expression during cardiac looping in tbx5 knockdown zebrafish embryos*. Journal of Biomedical Science, 2008. **15**(6): p. 779-787.

488. Ghosh, T.K., et al., *Physical interaction between TBX5 and MEF2C is required for early heart development*. Molecular and Cellular Biology, 2009. **29**(8): p. 2205-2218.
489. Takeuchi, J.K. and B.G. Bruneau, *Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors*. Nature, 2009. **459**(7247): p. 708-711.
490. Snyder, M., X.-Y. Huang, and J.J. Zhang, *Stat3 directly controls the expression of Tbx5, Nkx2.5, and GATA4 and is essential for cardiomyocyte differentiation of P19CL6 cells*. The Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(31): p. 23639-23646.
491. Dixon, J.E., et al., *Directed differentiation of human embryonic stem cells to interrogate the cardiac gene regulatory network*. Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy, 2011. **19**(9): p. 1695-1703.
492. Goetz, S.C., D.D. Brown, and F.L. Conlon, *TBX5 is required for embryonic cardiac cell cycle progression*. Development, 2006. **133**(13): p. 2575-2584.
493. Hatcher, C.J., et al., *TBX5 transcription factor regulates cell proliferation during cardiogenesis*. Developmental Biology, 2001. **230**(2): p. 177-188.
494. Ahn, D.-g., et al., *T-box gene tbx5 is essential for formation of the pectoral limb bud*. Nature, 2002. **417**(6890): p. 754-758.
495. Hatcher, C.J., et al., *A role for Tbx5 in proepicardial cell migration during cardiogenesis*. Physiol. Genomics, 2004. **18**(2): p. 129-140.
496. Camarata, T., et al., *LMP4 regulates Tbx5 protein subcellular localization and activity*. The Journal of Cell Biology, 2006. **174**(3): p. 339-348.

497. Takeuchi, J.K., et al., *Tbx5 specifies the left/right ventricles and ventricular septum position during cardiogenesis*. Development, 2003. **130**(24): p. 5953-5964.
498. Koshiba-Takeuchi, K., et al., *Cooperative and antagonistic interactions between Sall4 and Tbx5 pattern the mouse limb and heart*. Nat Genet, 2006. **38**(2): p. 175-183.
499. Koshiba-Takeuchi, K., et al., *Reptilian heart development and the molecular basis of cardiac chamber evolution*. Nature, 2009. **461**(7260): p. 95-98.
500. Puskaric, S., et al., *Shox2 mediates Tbx5 activity by regulating Bmp4 in the pacemaker region of the developing heart*. Human Molecular Genetics, 2010. **19**(23): p. 4625-4633.
501. Ching, Y.-H., et al., *Mutation in myosin heavy chain 6 causes atrial septal defect*. Nature Genetics, 2005. **37**(4): p. 423-428.
502. Maitra, M., et al., *Interaction of Gata4 and Gata6 with Tbx5 is critical for normal cardiac development*. Developmental Biology, 2009. **326**(2): p. 368-377.
503. Sakaki-Yumoto, M., et al., *The murine homolog of SALL4, a causative gene in Okihiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with Sall1 in anorectal, heart, brain and kidney development*. Development (Cambridge, England), 2006. **133**(15): p. 3005-3013.
504. Holt, M. and S. Oram, *Familial heart disease with skeletal malformations*. British Heart Journal, 1960. **22**: p. 236-242.
505. Basson, C.T., et al., *Mutations in human TBX5 cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome*. Nat Genet, 1997. **15**(1): p. 30-35.

- 506. Li, Q.Y., et al., *Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family*. Nat Genet, 1997. **15**(1): p. 21-29.
- 507. Newbury-Ecob, R.A., et al., *Holt-Oram syndrome: a clinical genetic study*. J Med Genet, 1996. **33**(4): p. 300-307.
- 508. Basson, C.T., et al., *Different TBX5 interactions in heart and limb defined by Holt-Oram syndrome mutations*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(6): p. 2919-2924.
- 509. Lehner, R., et al., *Pedigree analysis and descriptive investigation of three classic phenotypes associated with Holt-Oram syndrome*. The Journal of Reproductive Medicine, 2003. **48**(3): p. 153-159.
- 510. Basson, C.T., et al., *The clinical and genetic spectrum of the Holt-Oram syndrome (heart-hand syndrome)*. The New England Journal of Medicine, 1994. **330**(13): p. 885-891.
- 511. McDermott, D.A., et al., *TBX5 genetic testing validates strict clinical criteria for Holt-Oram syndrome*. Pediatric Research, 2005. **58**(5): p. 981-986.
- 512. Debeer, P., et al., *Novel TBX5 mutations in patients with Holt-Oram syndrome*. Clinical Orthopaedics and Related Research, 2007. **462**: p. 20-26.
- 513. Brassington, A.-M.E., et al., *Expressivity of Holt-Oram syndrome is not predicted by TBX5 genotype*. The American Journal of Human Genetics, 2003. **73**(1): p. 74-85.
- 514. Fan, C., et al., *Novel TBX5 mutations and molecular mechanism for Holt-Oram syndrome*. Journal of Medical Genetics, 2003. **40**(3): p. e29-e29.



515. Mori, A.D. and B.G. Bruneau, *TBX5 mutations and congenital heart disease: Holt-Oram syndrome revealed*. Current Opinion in Cardiology, 2004. **19**(3): p. 211-5.
516. Postma, A.V., et al., *A gain-of-function TBX5 mutation is associated with atypical Holt-Oram syndrome and paroxysmal atrial fibrillation*. Circ Res, 2008. **102**(11): p. 1433-1442.
517. Mori, A.D., et al., *Tbx5-dependent rheostatic control of cardiac gene expression and morphogenesis*. Developmental Biology, 2006. **297**(2): p. 566-586.
518. Cross, S.J., et al., *The mutation spectrum in Holt-Oram syndrome*. Journal of Medical Genetics, 2000. **37**(10): p. 785-787.
519. Takeuchi, J.K., et al., *Chromatin remodelling complex dosage modulates transcription factor function in heart development*. Nature Communications, 2011. **2**: p. 187-187.
520. Holm, H., et al., *Several common variants modulate heart rate, PR interval and QRS duration*. Nature Genetics, 2010. **42**(2): p. 117-122.
521. Smith, J.G., et al., *Genome-wide association studies of the PR interval in African Americans*. PLoS Genetics, 2011. **7**(2): p. e1001304-e1001304.
522. Levy, D., et al., *Genome-wide association study of blood pressure and hypertension*. Nature Genetics, 2009. **41**(6): p. 677-687.
523. Fox, E.R., et al., *Association of genetic variation with systolic and diastolic blood pressure among African Americans: the Candidate Gene Association Resource study*. Human Molecular Genetics, 2011. **20**(11): p. 2273-2284.
524. MacMahon, S., et al., *Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, Prolonged differences in blood pressure: prospective observational*

*studies corrected for the regression dilution bias.* Lancet, 1990. **335**(8692): p. 765-774.

525. Kasper, D.L., et al., *Part Eight : Disorders of the Cardiovascular System*, in *Harrison's Principles of Internal Medicine* 2005, McGraw-Hill Companies, Inc.: United States of America. p. 1301-1494.
526. Grech, V. and M. Gatt, *Syndromes and malformations associated with congenital heart disease in a population-based study.* International Journal of Cardiology, 1999. **68**(2): p. 151-156.
527. Meberg, A., J. Hals, and E. Thaulow, *Congenital heart defects - chromosomal anomalies, syndromes and extracardiac malformations.* Acta Pædiatrica, 2007. **96**(8): p. 1142-1145.
528. Moons, P., et al., *Congenital heart disease in 111 225 births in Belgium: birth prevalence, treatment and survival in the 21st century.* Acta Pædiatrica, 2009. **98**(3): p. 472-477.
529. Hoffman, J.I.E. and S. Kaplan, *The incidence of congenital heart disease.* Journal of the American College of Cardiology, 2002. **39**(12): p. 1890-1900.
530. van der Bom, T., et al., *The changing epidemiology of congenital heart disease.* Nature Reviews. Cardiology, 2011. **8**(1): p. 50-60.
531. Pierpont, M.E., et al., *Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics.* Circulation, 2007. **115**(23): p. 3015-3038.
532. Tanner, K., N. Sabrine, and C. Wren, *Cardiovascular malformations among preterm infants.* Pediatrics, 2005. **116**(6): p. e833-838-e833-838.

533. Wren, C., Z. Reinhardt, and K. Khawaja, *Twenty-year trends in diagnosis of life-threatening neonatal cardiovascular malformations*. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed., 2008. **93**(1): p. F33-35-F33-35.
534. Bull, C., *Current and potential impact of fetal diagnosis on prevalence and spectrum of serious congenital heart disease at term in the UK*. British Paediatric Cardiac Association. Lancet, 1999. **354**(9186): p. 1242-1247 ik-1242-1247 ik.
535. Germanakis, I. and S. Sifakis, *The impact of fetal echocardiography on the prevalence of liveborn congenital heart disease*. Pediatric Cardiology, 2006. **27**(4): p. 465-472.
536. Warnes, C.A., et al., *ACC/AHA 2008 Guidelines for the Management of Adults with Congenital Heart Disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (writing committee to develop guidelines on the management of adults with congenital heart disease)*. Circulation, 2008. **118**(23): p. e714-833-e714-833.
537. Pillutla, P., K.D. Shetty, and E. Foster, *Mortality associated with adult congenital heart disease: Trends in the US population from 1979 to 2005*. American Heart Journal, 2009. **158**(5): p. 874-879.
538. Oechslin, E.N., et al., *Mode of death in adults with congenital heart disease*. The American Journal of Cardiology, 2000. **86**(10): p. 1111-1116.
539. Verheugt, C.L., et al., *Mortality in adult congenital heart disease*. European Heart Journal, 2010. **31**(10): p. 1220-1229.
540. Ferencz, C., et al., *Congenital cardiovascular malformations associated with chromosome abnormalities: an epidemiologic study*. The Journal of Pediatrics, 1989. **114**(1): p. 79-86.

- 541. Johnson, M.C., et al., *Chromosome abnormalities in congenital heart disease*. American Journal of Medical Genetics, 1997. **70**(3): p. 292-298.
- 542. Krantz, I.D., et al., *Jagged1 mutations in patients ascertained with isolated congenital heart defects*. American Journal of Medical Genetics, 1999. **84**(1): p. 56-60.
- 543. Kuciene, R. and V. Dulskiene, *Selected environmental risk factors and congenital heart defects*. Medicina (Kaunas, Lithuania), 2008. **44**(11): p. 827-832.
- 544. Nora, J.J., *Multifactorial inheritance hypothesis for the etiology of congenital heart diseases. The genetic-environmental interaction*. Circulation, 1968. **38**(3): p. 604-617.
- 545. Roessler, E., et al., *Reduced NODAL signaling strength via mutation of several pathway members including FOXH1 is linked to human heart defects and holoprosencephaly*. American Journal of Human Genetics, 2008. **83**(1): p. 18-29.
- 546. Verkleij-Hagoort, A.C., et al., *Genetic and lifestyle factors related to the periconception vitamin B12 status and congenital heart defects: a Dutch case-control study*. Molecular Genetics and Metabolism, 2008. **94**(1): p. 112-119.
- 547. van Beynum, I.M., et al., *Maternal MTHFR 677C>T is a risk factor for congenital heart defects: effect modification by periconceptional folate supplementation*. European Heart Journal, 2006. **27**(8): p. 981-987.
- 548. van Driel, L.M.J.W., et al., *Eight-fold increased risk for congenital heart defects in children carrying the nicotinamide N-methyltransferase polymorphism and exposed to medicines and low nicotinamide*. European Heart Journal, 2008. **29**(11): p. 1424-1431.

549. van Beynum, I.M., et al., *Common 894G>T single nucleotide polymorphism in the gene coding for endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and risk of congenital heart defects*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: CCLM / FESCC, 2008. **46**(10): p. 1369-1375.
550. Loffredo, C.A., *Epidemiology of cardiovascular malformations: prevalence and risk factors*. American Journal of Medical Genetics, 2000. **97**(4): p. 319-325.
551. Hobbs, C.A., et al., *Congenital heart defects and genetic variants in the methylenetetrahydrofolate reductase gene*. Journal of Medical Genetics, 2006. **43**(2): p. 162-166.
552. van Beynum, I.M., et al., *The MTHFR 677C->T polymorphism and the risk of congenital heart defects: a literature review and meta-analysis*. QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians, 2007. **100**(12): p. 743-753.
553. Wessels, M.W. and P.J. Willems, *Genetic factors in non-syndromic congenital heart malformations*. Clinical Genetics, 2010. **78**(2): p. 103-123.
554. Garg, V., *Molecular genetics of aortic valve disease*. Current Opinion in Cardiology, 2006. **21**(3): p. 180-4.
555. Gebbia, M., et al., *X-linked situs abnormalities result from mutations in ZIC3*. Nature Genetics, 1997. **17**(3): p. 305-308.
556. Mégarbané, A., et al., *X-linked transposition of the great arteries and incomplete penetrance among males with a nonsense mutation in ZIC3*. European Journal of Human Genetics: EJHG, 2000. **8**(9): p. 704-708.
557. Purandare, S.M., et al., *A complex syndrome of left-right axis, central nervous system and axial skeleton defects in Zic3 mutant mice*. Development (Cambridge, England), 2002. **129**(9): p. 2293-2302.

558. Ware, S.M., et al., *Identification and functional analysis of ZIC3 mutations in heterotaxy and related congenital heart defects*. American Journal of Human Genetics, 2004. **74**(1): p. 93-105.
559. Chhin, B., et al., *Elucidation of penetrance variability of a ZIC3 mutation in a family with complex heart defects and functional analysis of ZIC3 mutations in the first zinc finger domain*. Human Mutation, 2007. **28**(6): p. 563-570.
560. Hoffman, J.I.E., S. Kaplan, and R.R. Liberthson, *Prevalence of congenital heart disease*. American Heart Journal, 2004. **147**(3): p. 425-439.
561. Roguin, N., et al., *High prevalence of muscular ventricular septal defect in neonates*. Journal of the American College of Cardiology, 1995. **26**(6): p. 1545-1548.
562. Barst, R.J., et al., *Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension*. Journal of the American College of Cardiology, 2004. **43**(12 Suppl S): p. 40S-47S-40S-47S.
563. Duffels, M.G.J., et al., *Pulmonary arterial hypertension in congenital heart disease: an epidemiologic perspective from a Dutch registry*. International Journal of Cardiology, 2007. **120**(2): p. 198-204.
564. Engelfriet, P.M., et al., *Pulmonary arterial hypertension in adults born with a heart septal defect: the Euro Heart Survey on adult congenital heart disease*. Heart (British Cardiac Society), 2007. **93**(6): p. 682-687.
565. Vongpatanasin, W., et al., *The Eisenmenger syndrome in adults*. Annals of Internal Medicine, 1998. **128**(9): p. 745-755.
566. van den Bosch, B.J.C., et al., *Early and transient gene expression changes in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in mice*. Genomics, 2006. **88**(4): p. 480-488.

567. Wojakowski, W., et al., *Very small embryonic-like stem cells in cardiovascular repair*. Pharmacology & Therapeutics, 2011. **129**(1): p. 21-28.
568. Bollini, S., N. Smart, and P.R. Riley, *Resident cardiac progenitor cells: at the heart of regeneration*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2011. **50**(2): p. 296-303.
569. Anversa, P., et al., *Stereological measurement of cellular and subcellular hypertrophy and hyperplasia in the papillary muscle of adult rat*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1980. **12**(8): p. 781-795.
570. Anversa, P., A.V. Loud, and L. Vitali-Mazza, *Morphometry and autoradiography of early hypertrophic changes in the ventricular myocardium of adult rat: an electron microscopic study*. Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology, 1976. **35**(5): p. 475-83.
571. Anversa, P., et al., *Absolute morphometric study of myocardial hypertrophy in experimental hypertension. II. Ultrastructure of myocytes and interstitium*. Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology, 1978. **38**(5): p. 597-609.
572. Loud, A.V., et al., *Absolute morphometric study of myocardial hypertrophy in experimental hypertension. I. Determination of myocyte size*. Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology, 1978. **38**(5): p. 586-96.
573. Grimm, A.F., L. De La Torre, and M. La Porta, *Ventricular nuclei-DNA relationships with myocardial growth and hypertrophy in the rat*. Circ Res, 1970. **26**(1): p. 45-52.

574. Barry, S.P., S.M. Davidson, and P.A. Townsend, *Molecular regulation of cardiac hypertrophy*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2008. **40**(10): p. 2023-2039.
575. de Bold, A.J., et al., *A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats*. Life Sciences, 1981. **28**(1): p. 89-94.
576. de Bold, A.J. and T.G. Flynn, *Cardionatrin I - a novel heart peptide with potent diuretic and natriuretic properties*. Life Sciences, 1983. **33**(3): p. 297-302.
577. Flynn, T.G., M.L. de Bold, and A.J. de Bold, *The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1983. **117**(3): p. 859-865.
578. Kangawa, K. and H. Matsuo, *Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide (alpha-hANP)*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1984. **118**(1): p. 131-139.
579. Kangawa, K., et al., *Purification and complete amino acid sequence of beta-rat atrial natriuretic polypeptide (beta-rANP) of 5,000 daltons*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1984. **119**(3): p. 933-940.
580. Sudoh, T., et al., *A new natriuretic peptide in porcine brain*. Nature, 1988. **332**(6159): p. 78-81.
581. Sudoh, T., et al., *C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1990. **168**(2): p. 863-870.



- 582. Nakao, K., et al., *Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: Natriuretic peptides*. Journal of Hypertension, 1992. **10**(9): p. 907-912.
- 583. Nakao, K., et al., *Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. II: Natriuretic peptide receptors*. Journal of Hypertension, 1992. **10**(10): p. 1111-1114.
- 584. John, S.W., et al., *Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension*. Science (New York, N.Y.), 1995. **267**(5198): p. 679-681.
- 585. Lopez, M.J., et al., *Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide*. Nature, 1995. **378**(6552): p. 65-68.
- 586. Oliver, P.M., et al., *Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(26): p. 14730-14735.
- 587. Barbee, R.W., et al., *Hemodynamics in transgenic mice with overexpression of atrial natriuretic factor*. Circulation Research, 1994. **74**(4): p. 747-751.
- 588. Schillinger, K.J., et al., *Regulatable atrial natriuretic peptide gene therapy for hypertension*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(39): p. 13789-13794.
- 589. Therrien, J.-P., et al., *A gene therapy approach for long-term normalization of blood pressure in hypertensive mice by ANP-secreting human skin grafts*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(3): p. 1178-1183.

590. Newton-Cheh, C., et al., *Association of common variants in NPPA and NPPB with circulating natriuretic peptides and blood pressure*. *Nature Genetics*, 2009. **41**(3): p. 348-353.
591. Conen, D., et al., *Natriuretic peptide precursor a gene polymorphisms and risk of blood pressure progression and incident hypertension*. *Hypertension*, 2007. **50**(6): p. 1114-1119.
592. Nakayama, T., et al., *Nucleotide sequence of the 5'-flanking region of the type A human natriuretic peptide receptor gene and association analysis using a novel microsatellite in essential hypertension*. *American Journal of Hypertension*, 1999. **12**(11 Pt 1): p. 1144-1148.
593. Nakayama, T., et al., *Functional deletion mutation of the 5'-flanking region of type A human natriuretic peptide receptor gene and its association with essential hypertension and left ventricular hypertrophy in the Japanese*. *Circulation Research*, 2000. **86**(8): p. 841-845.
594. Rubattu, S., et al., *Association of atrial natriuretic peptide and type a natriuretic peptide receptor gene polymorphisms with left ventricular mass in human essential hypertension*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2006. **48**(3): p. 499-505.
595. Dries, D.L., et al., *Corin gene minor allele defined by 2 missense mutations is common in blacks and associated with high blood pressure and hypertension*. *Circulation*, 2005. **112**(16): p. 2403-2410.
596. Li, Y., et al., *Guanylyl cyclase-A inhibits angiotensin II type 1A receptor-mediated cardiac remodeling, an endogenous protective mechanism in the heart*. *Circulation*, 2002. **106**(13): p. 1722-1728.
597. Holtwick, R., et al., *Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor*

- guanylyl cyclase-A*. The Journal of Clinical Investigation, 2003. **111**(9): p. 1399-1407.
598. Nakanishi, M., et al., *Role of natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A in myocardial infarction evaluated using genetically engineered mice*. Hypertension, 2005. **46**(2): p. 441-447.
  599. Feng, J.A., et al., *Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in atrial natriuretic peptide-deficient mice*. Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology, 2003. **30**(5-6): p. 343-349.
  600. Klaiber, M., et al., *Novel insights into the mechanisms mediating the local antihypertrophic effects of cardiac atrial natriuretic peptide: role of cGMP-dependent protein kinase and RGS2*. Basic Research in Cardiology, 2010. **105**(5): p. 583-595.
  601. Fujisaki, H., et al., *Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression*. The Journal of Clinical Investigation, 1995. **96**(2): p. 1059-1065.
  602. Sadoshima, J. and S. Izumo, *Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype*. Circulation Research, 1993. **73**(3): p. 413-423.
  603. Schlüter, K.D. and S. Wenzel, *Angiotensin II: a hormone involved in and contributing to pro-hypertrophic cardiac networks and target of anti-hypertrophic cross-talks*. Pharmacology & Therapeutics, 2008. **119**(3): p. 311-325.
  604. Calderone, A., et al., *Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts*. The Journal of Clinical Investigation, 1998. **101**(4): p. 812-818.

- 605. Glenn, D.J., et al., *Atrial natriuretic peptide suppresses endothelin gene expression and proliferation in cardiac fibroblasts through a GATA4-dependent mechanism*. Cardiovascular Research, 2009. **84**(2): p. 209-217.
- 606. Tamura, N., et al., *Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(8): p. 4239-4244.
- 607. Kapoun, A.M., et al., *B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor-beta in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation*. Circ Res, 2004. **94**(4): p. 453-461.
- 608. Houweling, A.C., et al., *Expression and regulation of the atrial natriuretic factor encoding gene Nppa during development and disease*. Cardiovasc Res, 2005. **67**(4): p. 583-593.
- 609. LaPointe, M.C., et al., *Tissue-specific expression of the human brain natriuretic peptide gene in cardiac myocytes*. Hypertension, 1996. **27**(3): p. 715-722.
- 610. Thuerauf, D.J. and C.C. Glembotski, *Differential effects of protein kinase C, Ras, and Raf-1 kinase on the induction of the cardiac B-type natriuretic peptide gene through a critical promoter-proximal M-CAT element*. J. Biol. Chem., 1997. **272**(11): p. 7464-7472.
- 611. Marttila, M., et al., *GATA4 mediates activation of the B-type natriuretic peptide gene expression in response to hemodynamic stress*. Endocrinology, 2001. **142**(11): p. 4693-4700.
- 612. Ogawa, Y., et al., *Characterization of the 5'-flanking region and chromosomal assignment of the human brain natriuretic peptide gene*. Journal of Molecular Medicine, 1995. **73**(9): p. 457-463.

613. He, Q. and M.C. LaPointe, *Src and Rac mediate endothelin-1 and lysophosphatidic acid stimulation of the human brain natriuretic peptide promoter*. Hypertension, 2001. **37**(2): p. 478-484.
614. He, Q., et al., *Inducible regulation of human brain natriuretic peptide promoter in transgenic mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(1): p. H368-376-H368-376.
615. Ogawa, E., et al., *Fibronectin signaling stimulates BNP gene transcription by inhibiting neuron-restrictive silencer element-dependent repression*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(2): p. 451-459.
616. LaPointe, M.C., *Molecular regulation of the brain natriuretic peptide gene*. Peptides, 2005. **26**(6): p. 944-956.
617. Ma, K.K., K. Banas, and A.J. de Bold, *Determinants of inducible brain natriuretic peptide promoter activity*. Regulatory Peptides, 2005. **128**(3): p. 169-176.
618. Knowlton, K.U., et al., *Divergent pathways mediate the induction of ANF transgenes in neonatal and hypertrophic ventricular myocardium*. The Journal of Clinical Investigation, 1995. **96**(3): p. 1311-8.
619. Horsthuis, T., et al., *Distinct regulation of developmental and heart disease-induced atrial natriuretic factor expression by two separate distal sequences*. Circ Res, 2008. **102**(7): p. 849-859.
620. Knowlton, K.U., et al., *Co-regulation of the atrial natriuretic factor and cardiac myosin light chain-2 genes during alpha-adrenergic stimulation of neonatal rat ventricular cells. Identification of cis sequences within an embryonic and a constitutive contractile protein gene which mediate inducible expression*. J. Biol. Chem., 1991. **266**(12): p. 7759-7768.

621. Sprenkle, A.B., S.F. Murray, and C.C. Glembotski, *Involvement of multiple cis elements in basal- and alpha-adrenergic agonist-inducible atrial natriuretic factor transcription. Roles for serum response elements and an SP-1-like element*. Circ Res, 1995. **77**(6): p. 1060-1069.
622. von Harsdorf, R., et al., *Identification of a cis-acting regulatory element conferring inducibility of the atrial natriuretic factor gene in acute pressure overload*. The Journal of Clinical Investigation, 1997. **100**(5): p. 1294-1304.
623. Seidman, C.E., E.V. Schmidt, and J.G. Seidman, *cis-dominance of rat atrial natriuretic factor gene regulatory sequences in transgenic mice*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 1991. **69**(10): p. 1486-1492.
624. Argentin, S., et al., *Developmental stage-specific regulation of atrial natriuretic factor gene transcription in cardiac cells*. Mol. Cell. Biol., 1994. **14**(1): p. 777-790.
625. He, Q. and M.C. LaPointe, *Interleukin-1beta regulation of the human brain natriuretic peptide promoter involves Ras-, Rac-, and p38 kinase-dependent pathways in cardiac myocytes*. Hypertension, 1999. **33**(1): p. 283-289.
626. Masters, R.G., et al., *Discoordinate modulation of natriuretic peptides during acute cardiac allograft rejection in humans*. Circulation, 1999. **100**(3): p. 287-291.
627. Tomaru Ki, K.-i., et al., *Transcriptional activation of the BNP gene by lipopolysaccharide is mediated through GATA elements in neonatal rat cardiac myocytes*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2002. **34**(6): p. 649-659.
628. Ma, K.K., T. Ogawa, and A.J. de Bold, *Selective upregulation of cardiac brain natriuretic peptide at the transcriptional and translational levels by pro-inflammatory cytokines and by conditioned medium derived from mixed*

*lymphocyte reactions via p38 MAP kinase*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2004. **36**(4): p. 505-513.

629. Meirovich, Y.F., et al., *Relationship between natriuretic peptides and inflammation: proteomic evidence obtained during acute cellular cardiac allograft rejection in humans*. The Journal of Heart and Lung Transplantation, 2008. **27**(1): p. 31-37.
630. Theo Sijtsse Palstra, R.-J., *Close encounters of the 3C kind: long-range chromatin interactions and transcriptional regulation*. Briefings in Functional Genomics & Proteomics, 2009. **8**(4): p. 297-309.
631. Tsai, E.J. and D.A. Kass, *Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics*. Pharmacology & Therapeutics, 2009. **122**(3): p. 216-238.
632. Friebe, A., et al., *Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(18): p. 7699-7704.
633. Friebe, A. and D. Koesling, *The function of NO-sensitive guanylyl cyclase: what we can learn from genetic mouse models*. Nitric Oxide: Biology and Chemistry / Official Journal of the Nitric Oxide Society, 2009. **21**(3-4): p. 149-156.
634. Mergia, E., D. Koesling, and A. Friebe, *Genetic mouse models of the NO receptor 'soluble' guanylyl cyclases*. Handbook of Experimental Pharmacology, 2009(191): p. 33-46.
635. Groneberg, D., et al., *Smooth muscle-specific deletion of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is sufficient to induce hypertension in mice*. Circulation, 2010. **121**(3): p. 401-409.

636. Tsutsui, M., et al., *Development of genetically engineered mice lacking all three nitric oxide synthases*. Journal of Pharmacological Sciences, 2006. **102**(2): p. 147-154.
637. Nakata, S., et al., *Spontaneous myocardial infarction in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms*. Circulation, 2008. **117**(17): p. 2211-2223.
638. Morishita, T., et al., *Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(30): p. 10616-10621.
639. Shibata, K., et al., *Spontaneous development of left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in mice lacking all nitric oxide synthases*. Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society, 2010. **74**(12): p. 2681-2692.
640. Durán, W.N., J.W. Breslin, and F.A. Sánchez, *The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability*. Cardiovascular Research, 2010. **87**(2): p. 254-261.
641. Elrod, J.W., et al., *Nitric oxide promotes distant organ protection: evidence for an endocrine role of nitric oxide*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(32): p. 11430-11435.
642. Yang, X.P., et al., *Endothelial nitric oxide gene knockout mice: cardiac phenotypes and the effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor on myocardial ischemia/reperfusion injury*. Hypertension, 1999. **34**(1): p. 24-30.
643. Ruetten, H., et al., *Concentric left ventricular remodeling in endothelial nitric oxide synthase knockout mice by chronic pressure overload*. Cardiovascular Research, 2005. **66**(3): p. 444-453.



644. Flaherty, M.P., et al., *eNOS deficient mice develop progressive cardiac hypertrophy with altered cytokine and calcium handling protein expression*. Cardiovascular Toxicology, 2007. **7**(3): p. 165-177.
645. Han, R.N.N., et al., *Defective lung vascular development and fatal respiratory distress in endothelial NO synthase-deficient mice: a model of alveolar capillary dysplasia?* Circulation Research, 2004. **94**(8): p. 1115-1123.
646. Feng, Q., et al., *Development of heart failure and congenital septal defects in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. Circulation, 2002. **106**(7): p. 873-879.
647. Lee, T.C., et al., *Abnormal aortic valve development in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. Circulation, 2000. **101**(20): p. 2345-2348.
648. Groenendijk, B.C.W., et al., *Development-related changes in the expression of shear stress responsive genes KLF-2, ET-1, and NOS-3 in the developing cardiovascular system of chicken embryos*. Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists, 2004. **230**(1): p. 57-68.
649. Huang, P.L., et al., *Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase*. Nature, 1995. **377**(6546): p. 239-242.
650. Shesely, E.G., et al., *Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(23): p. 13176-13181.
651. Chataigneau, T., et al., *Acetylcholine-induced relaxation in blood vessels from endothelial nitric oxide synthase knockout mice*. British Journal of Pharmacology, 1999. **126**(1): p. 219-226.

652. Takaki, A., et al., *Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice*. The Journal of Experimental Medicine, 2008. **205**(9): p. 2053-2063.
653. Ohashi, Y., et al., *Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase*. The Journal of Clinical Investigation, 1998. **102**(12): p. 2061-2071.
654. Bauersachs, J. and J.D. Widder, *Endothelial dysfunction in heart failure*. Pharmacological Reports: PR, 2008. **60**(1): p. 119-126.
655. Atochin, D.N. and P.L. Huang, *Endothelial nitric oxide synthase transgenic models of endothelial dysfunction*. Pflügers Archiv: European Journal of Physiology, 2010. **460**(6): p. 965-974.
656. Huang, P.L., *eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease*. Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM, 2009. **20**(6): p. 295-302.
657. Kim, J.-a., et al., *Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms*. Circulation, 2006. **113**(15): p. 1888-1904.
658. Freedman, J.E., et al., *Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene*. Circulation Research, 1999. **84**(12): p. 1416-1421.
659. Lefer, D.J., et al., *Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice*. The American Journal of Physiology, 1999. **276**(6 Pt 2): p. H1943-1950-H1943-1950.
660. Kuhlencordt, P.J., et al., *Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial activation: insights from eNOS knockout endothelial cells*.

American Journal of Physiology. Cell Physiology, 2004. **286**(5): p. C1195-1202-C1195-1202.

661. Jonk, A.M., et al., *Microvascular dysfunction in obesity: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension*. Physiology (Bethesda, Md.), 2007. **22**: p. 252-260.
662. Serné, E.H., et al., *Microvascular dysfunction: a potential pathophysiological role in the metabolic syndrome*. Hypertension, 2007. **50**(1): p. 204-211.
663. Nisoli, E., et al., *Defective mitochondrial biogenesis: a hallmark of the high cardiovascular risk in the metabolic syndrome?* Circulation Research, 2007. **100**(6): p. 795-806.
664. Nisoli, E., et al., *Effects of nitric oxide on proliferation and differentiation of rat brown adipocytes in primary cultures*. British Journal of Pharmacology, 1998. **125**(4): p. 888-894.
665. Huang, Z., et al., *Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine*. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 1996. **16**(5): p. 981-987.
666. Atochin, D.N., et al., *The phosphorylation state of eNOS modulates vascular reactivity and outcome of cerebral ischemia in vivo*. The Journal of Clinical Investigation, 2007. **117**(7): p. 1961-1967.
667. Jones, S.P., et al., *Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates congestive heart failure in mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(8): p. 4891-4896.
668. Ozaki, M., et al., *Overexpression of endothelial nitric oxide synthase attenuates cardiac hypertrophy induced by chronic isoproterenol infusion*.

Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society, 2002. **66**(9): p. 851-856.

669. Jones, S.P., et al., *Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates myocardial reperfusion injury*. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, 2004. **286**(1): p. H276-282-H276-282.
670. Brunner, F., et al., *Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase*. Cardiovascular Research, 2003. **57**(1): p. 55-62.
671. du Toit, E.F., et al., *Efficacy of ischaemic preconditioning in the eNOS overexpressed working mouse heart model*. European Journal of Pharmacology, 2007. **556**(1-3): p. 115-120.
672. Zintzaras, E., G. Kitsios, and I. Stefanidis, *Endothelial NO synthase gene polymorphisms and hypertension: a meta-analysis*. Hypertension, 2006. **48**(4): p. 700-710.
673. Colombo, M.G., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease*. Clinical Chemistry, 2003. **49**(3): p. 389-395.
674. Rossi, G.P., et al., *The T-786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA study*. Journal of the American College of Cardiology, 2003. **41**(6): p. 930-937.
675. Colombo, M.G., et al., *Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298-->Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease*. Heart (British Cardiac Society), 2002. **87**(6): p. 525-528.

676. Ciftçi, C., et al., *Association of endothelial nitric oxide synthase promoter region (T-786C) gene polymorphism with acute coronary syndrome and coronary heart disease*. *Lipids in Health and Disease*, 2008. **7**: p. 5-5.
677. Yoshimura, M., et al., *A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese*. *Human Genetics*, 1998. **103**(1): p. 65-69.
678. Nakayama, M., et al., *T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm*. *Circulation*, 1999. **99**(22): p. 2864-2870.
679. Zintzaras, E., A.A. Papathanasiou, and I. Stefanidis, *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and diabetic nephropathy: a HuGE review and meta-analysis*. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 2009. **11**(10): p. 695-706.
680. Asakimori, Y., et al., *T(-786)-->C polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene influences the progression of renal disease*. *Nephron*, 2002. **91**(4): p. 747-751.
681. Erbs, S., et al., *Promoter but not exon 7 polymorphism of endothelial nitric oxide synthase affects training-induced correction of endothelial dysfunction*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2003. **23**(10): p. 1814-1819.
682. Godfrey, V., et al., *The functional consequence of the Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene in young healthy volunteers*. *Cardiovascular Drug Reviews*, 2007. **25**(3): p. 280-288.
683. Cruz-González, I., et al., *Association between -T786C NOS3 polymorphism and resistant hypertension: a prospective cohort study*. *BMC Cardiovascular Disorders*, 2009. **9**: p. 35-35.

684. Dias, R.G., et al., *Glu298Asp eNOS gene polymorphism causes attenuation in nonexercising muscle vasodilatation*. Physiological Genomics, 2009. **37**(2): p. 99-107.
685. Leeson, C.P.M., et al., *Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism interacts with environmental and dietary factors to influence endothelial function*. Circulation Research, 2002. **90**(11): p. 1153-1158.
686. Dias, R.G., M.M. Gowdak, and A.C. Pereira, *Genetics and cardiovascular system: influence of human genetic variants on vascular function*. Genes & Nutrition, 2011. **6**(1): p. 55-62.
687. Georges, R., et al., *Distinct expression and function of alternatively spliced Tbx5 isoforms in cell growth and differentiation*. Molecular and Cellular Biology, 2008. **28**(12): p. 4052-4067.
688. Nadeau, M., et al., *An endocardial pathway involving Tbx5, Gata4, and Nos3 required for atrial septum formation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(45): p. 19356-19361.
689. Georges, R.O., et al., *Nppb/Nppa developmental ventricular expression fine-tuning during cardiogenesis*. 2011. **Submitted**.
690. Kisanuki, Y.Y., et al., *Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo*. Developmental Biology, 2001. **230**(2): p. 230-242.
691. He, M.-L., et al., *Induction of apoptosis and inhibition of cell growth by developmental regulator hTBX5*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. **297**(2): p. 185-192.

- 692. Camarata, T., et al., *Pdlim7 (LMP4) regulation of Tbx5 specifies zebrafish heart atrio-ventricular boundary and valve formation*. Developmental Biology, 2009.
- 693. Krause, A., et al., *Tbx5 and Tbx4 transcription factors interact with a new chicken PDZ-LIM protein in limb and heart development*. Developmental Biology, 2004. **273**(1): p. 106-120.
- 694. Kulisz, A. and H.-G. Simon, *An evolutionarily conserved nuclear export signal facilitates cytoplasmic localization of the Tbx5 transcription factor*. Mol. Cell. Biol., 2008. **28**(5): p. 1553-1564.
- 695. Nadeau, M., et al., *An endocardial pathway involving Tbx5, Gata4, and Nos3 required for atrial septum formation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010.
- 696. Koshiba-Takeuchi, K., et al., *Tbx5 and the retinotectum projection*. Science (New York, N.Y.), 2000. **287**(5450): p. 134-137.
- 697. Crispino, J.D., et al., *Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors*. Genes & Development, 2001. **15**(7): p. 839-844.
- 698. Watt, A.J., et al., *GATA4 is essential for formation of the proepicardium and regulates cardiogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(34): p. 12573-12578.
- 699. Rivera-Feliciano, J., et al., *Development of heart valves requires Gata4 expression in endothelial-derived cells*. Development, 2006. **133**(18): p. 3607-3618.
- 700. Pandey, G., et al., *An integrative multi-network and multi-classifier approach to predict genetic interactions*. PLoS Computational Biology, 2010. **6**(9).

701. Lee, I., et al., *Predicting genetic modifier loci using functional gene networks*. Genome Research, 2010. **20**(8): p. 1143-1153.
702. Liang, J., et al., *Elevated glucose induces congenital heart defects by altering the expression of *tbx5*, *tbx20*, and *has2* in developing zebrafish embryos*. Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology, 2010. **88**(6): p. 480-486.
703. Shaw, G.M., et al., *Risks of human conotruncal heart defects associated with 32 single nucleotide polymorphisms of selected cardiovascular disease-related genes*. American Journal of Medical Genetics. Part A, 2005. **138**(1): p. 21-26.
704. Hingorani, A.D., *Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000*. Atherosclerosis, 2001. **154**(3): p. 521-527.
705. Veldman, B.A., et al., *The Glu298Asp polymorphism of the NOS 3 gene as a determinant of the baseline production of nitric oxide*. Journal of Hypertension, 2002. **20**(10): p. 2023-2027.
706. Cherney, D.Z.I., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the renal hemodynamic response to L-arginine*. Kidney International, 2009. **75**(3): p. 327-332.
707. Tesauro, M., et al., *Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(6): p. 2832-2835.
708. Fairchild, T.A., et al., *Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu(298)-->Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase*. The Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(28): p. 26674-26679.



- 709. Liu, C.-x., et al., *Association of TBX5 gene polymorphism with ventricular septal defect in the Chinese Han population*. Chinese Medical Journal, 2009. **122**(1): p. 30-34.
- 710. Franco, D., et al., *Left and right ventricular contributions to the formation of the interventricular septum in the mouse heart*. Developmental Biology, 2006. **294**(2): p. 366-375.
- 711. Pan, Q., et al., *Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing*. Nature Genetics, 2008. **40**(12): p. 1413-1415.
- 712. Wang, E.T., et al., *Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes*. Nature, 2008. **456**(7221): p. 470-476.
- 713. Revil, T., et al., *Alternative splicing is frequent during early embryonic development in mouse*. BMC Genomics, 2010. **11**: p. 399-399.
- 714. Kalsotra, A., et al., *A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(51): p. 20333-20338.
- 715. Salomonis, N., et al., *Alternative splicing in the differentiation of human embryonic stem cells into cardiac precursors*. PLoS Computational Biology, 2009. **5**(11): p. e1000553-e1000553.
- 716. Salomonis, N., et al., *Alternative splicing regulates mouse embryonic stem cell pluripotency and differentiation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(23): p. 10514-10519.
- 717. Xu, X., et al., *ASF/SF2-regulated CaMKII $\delta$  alternative splicing temporally reprograms excitation-contraction coupling in cardiac muscle*. Cell, 2005. **120**(1): p. 59-72.

718. Ding, J.-H., et al., *Dilated cardiomyopathy caused by tissue-specific ablation of SC35 in the heart*. The EMBO Journal, 2004. **23**(4): p. 885-896.
719. Feng, Y., et al., *SRp38 regulates alternative splicing and is required for Ca(2+) handling in the embryonic heart*. Developmental Cell, 2009. **16**(4): p. 528-538.
720. Miano, J.M., *Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2003. **35**(6): p. 577-593.
721. Yang, Y., et al., *Stretch-induced alternative splicing of serum response factor promotes bronchial myogenesis and is defective in lung hypoplasia*. The Journal of Clinical Investigation, 2000. **106**(11): p. 1321-1330.
722. Davis, F.J., et al., *Increased expression of alternatively spliced dominant-negative isoform of SRF in human failing hearts*. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, 2002. **282**(4): p. H1521-1533-H1521-1533.
723. Zhang, X., et al., *Alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay regulate gene expression of serum response factor*. Gene, 2007. **400**(1-2): p. 131-139.
724. Dale, R.M., B.F. Remo, and E.C. Svensson, *An alternative transcript of the FOG-2 gene encodes a FOG-2 isoform lacking the FOG repression motif*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **357**(3): p. 683-687.
725. Sun, Q., et al., *A splice variant of cyclin D2 regulates cardiomyocyte cell cycle through a novel protein aggregation pathway*. Journal of Cell Science, 2009. **122**(Pt 10): p. 1563-1573.

726. Imamura, M., et al., *Expression and functional activity of four myocardin isoforms*. Gene, 2010. **464**(1-2): p. 1-10.
727. Murakami, M., Y. Iwata, and M. Funaba, *Expression and transcriptional activity of alternative splice variants of Mitf exon 6*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2007. **303**(1-2): p. 251-257.
728. Tshori, S., et al., *Microphthalmia transcription factor isoforms in mast cells and the heart*. Mol. Cell. Biol., 2007. **27**(11): p. 3911-3919.
729. Fan, W., et al., *TBX3 and its isoform TBX3+2a are functionally distinctive in inhibition of senescence and are overexpressed in a subset of breast cancer cell lines*. Cancer Research, 2004. **64**(15): p. 5132-5139.
730. Hoogaars, W.M.H., et al., *TBX3 and its splice variant TBX3 + exon 2a are functionally similar*. Pigment Cell & Melanoma Research, 2008. **21**(3): p. 379-387.
731. Jezewski, P.A., et al., *Alternative splicing, phylogenetic analysis, and craniofacial expression of zebrafish tbx22*. Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists, 2009. **238**(6): p. 1605-1612.
732. Brummelkamp, T.R., et al., *TBX-3, the gene mutated in Ulnar-Mammary Syndrome, is a negative regulator of p19ARF and inhibits senescence*. J. Biol. Chem., 2002. **277**(8): p. 6567-6572.
733. Murakami, M., et al., *A WW domain protein TAZ is a critical coactivator for TBX5, a transcription factor implicated in Holt-Oram syndrome*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(50): p. 18034-18039.

734. DeBenedittis, P., et al., *Characterization of the novel interaction between muskelin and TBX20, a critical cardiogenic transcription factor*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011. **409**(2): p. 338-343.
735. Garrity, D.M., S. Childs, and M.C. Fishman, *The heartstrings mutation in zebrafish causes heart/fin Tbx5 deficiency syndrome*. Development (Cambridge, England), 2002. **129**(19): p. 4635-4645.
736. Fan, C., Q. Chen, and Q.K. Wang, *Functional role of transcriptional factor TBX5 in pre-mRNA splicing and Holt-Oram syndrome via association with SC35*. The Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(38): p. 25653-25663.
737. Fan, C., M. Liu, and Q. Wang, *Functional analysis of TBX5 missense mutations associated with Holt-Oram syndrome*. The Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(10): p. 8780-8785.
738. Murga-Eizagaechegarria, N., M. Garcia-Barcina, and E. Sarasola Diez, *Holt-Oram syndrome: family affected without TBX5 mutation and without phenotype manifestations in a probable mutation carrier*. Revista Espanola De Cardiologia, 2011.
739. Borozdin, W., et al., *Expanding the spectrum of TBX5 mutations in Holt-Oram syndrome: detection of two intragenic deletions by quantitative real time PCR, and report of eight novel point mutations*. Human Mutation, 2006. **27**(9): p. 975-976.
740. Trajanovska, S., et al., *Genomic analyses and cloning of novel chicken natriuretic peptide genes reveal new insights into natriuretic peptide evolution*. Peptides, 2007. **28**(11): p. 2155-2163.
741. Houweling, A.C., et al., *Comparative analysis of the natriuretic peptide precursor gene cluster in vertebrates reveals loss of ANF and retention of CNP-3 in chicken*. Developmental Dynamics, 2005. **233**(3): p. 1076-1082.

742. Trajanovska, S. and J.A. Donald, *Molecular cloning of natriuretic peptides from the heart of reptiles: loss of ANP in diapsid reptiles and birds*. General and Comparative Endocrinology, 2008. **156**(2): p. 339-346.
743. Gibson-Brown, J.J., et al., *Expression of T-box genes Tbx2-Tbx5 during chick organogenesis*. Mechanisms of Development, 1998. **74**(1-2): p. 165-169.
744. Bruneau, B.G., et al., *Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome*. Developmental Biology, 1999. **211**(1): p. 100-108.
745. Biben, C. and R.P. Harvey, *Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene eHand during murine heart development*. Genes & Development, 1997. **11**(11): p. 1357-69.
746. Togi, K., et al., *Essential role of Hand2 in interventricular septum formation and trabeculation during cardiac development*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006. **343**(1): p. 144-151.
747. Srivastava, D., P. Cserjesi, and E.N. Olson, *A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis*. Science (New York, N.Y.), 1995. **270**(5244): p. 1995-9.
748. Schwartz, R.J. and E.N. Olson, *Building the heart piece by piece: modularity of cis-elements regulating Nkx2-5 transcription*. Development, 1999. **126**(19): p. 4187-4192.
749. Lien, C.L., et al., *Control of early cardiac-specific transcription of Nkx2-5 by a GATA-dependent enhancer*. Development, 1999. **126**(1): p. 75-84.
750. McFadden, D.G., et al., *A GATA-dependent right ventricular enhancer controls dHAND transcription in the developing heart*. Development, 2000. **127**(24): p. 5331-5341.

751. Ross, R.S., et al., *An HF-1a/HF-1b/MEF-2 combinatorial element confers cardiac ventricular specificity and established an anterior-posterior gradient of expression*. Development, 1996. **122**(6): p. 1799-1809.
752. Kimura, S., et al., *A 900 bp genomic region from the mouse dystrophin promoter directs lacZ reporter expression only to the right heart of transgenic mice*. Development, Growth & Differentiation, 1997. **39**(3): p. 257-265.
753. Ahuja, P., et al., *Myc controls transcriptional regulation of cardiac metabolism and mitochondrial biogenesis in response to pathological stress in mice*. The Journal of Clinical Investigation, 2010. **120**(5): p. 1494-1505.
754. Visel, A., et al., *Functional autonomy of distant-acting human enhancers*. Genomics, 2009. **93**(6): p. 509-513.
755. Prabhakar, S., et al., *Human-specific gain of function in a developmental enhancer*. Science, 2008. **321**(5894): p. 1346-1350.
756. Boer, B., et al., *Distal enhancer of the mouse FGF-4 gene and its human counterpart exhibit differential activity: critical role of a GT box*. Molecular Reproduction and Development, 2005. **71**(3): p. 263-274.
757. Prud'homme, B., et al., *Repeated morphological evolution through cis-regulatory changes in a pleiotropic gene*. Nature, 2006. **440**(7087): p. 1050-1053.
758. Frankel, N., et al., *Phenotypic robustness conferred by apparently redundant transcriptional enhancers*. Nature, 2010. **466**(7305): p. 490-493.
759. Perry, M.W., et al., *Shadow enhancers foster robustness of Drosophila gastrulation*. Current Biology: CB, 2010. **20**(17): p. 1562-1567.

760. He, A., et al., *Co-occupancy by multiple cardiac transcription factors identifies transcriptional enhancers active in heart*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(14): p. 5632-5637.

